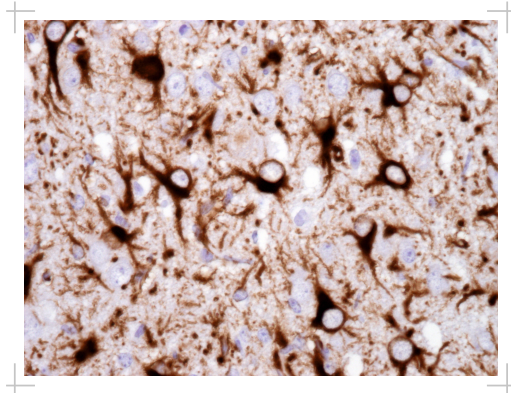


MANUELA HIRZ

Pathogenese epileptiformer Krämpfe bei TNF-transgenen
Mäusen nach Borna disease virus-Infektion:

Rolle von astroglialen Dysfunktionen



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christiane Herden

**Pathogenese epileptiformer Krämpfe bei TNF-transgenen Mäusen
nach *Borna disease virus*-Infektion:
Rolle von astroglialen Dysfunktionen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Manuela Hirz

Tierärztin aus Gießen, Hessen

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. habil. C. Herden
Prof. Dr. habil. J. Roth

Tag der Disputation: 26.10.2017

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Daten der vorliegenden Arbeit wurden für folgende Publikationen und Kongressbeiträge verwandt:

Hirz M., Eisel U. L. M., Culmsee C., Herden C. (2013) Susceptibility of mouse astrocytes with altered TNF system against treatment with tumor necrosis factor and/or glutamate; Clinical Neuropathology, 32: 423-424 (Abstract)

Ahlemeyer B., Kehr K., Richter E., Hirz M., Baumgart-Vogt E., Herden C. (2013) Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions; Journal of Neuroscience Methods, 212: 156-164

Vienenkötter J., Eisel U. L. M., Culmsee C., Hirz M., Herden C. (2016) Untersuchung der Rolle von Lipocalin-2 in viral induzierten neuroinflammatorischen Prozessen an BDV-infizierten TNF-transgenen und TNF-Rezeptor-knockout-Mäusen; Tierärztliche Praxis Kleintiere, 3: A34 (Abstract)

**Diese Arbeit wurde finanziell gefördert durch ein Stipendium der
von Bodelschwingschen Stiftungen Bethel, Gesellschaft für Epilepsieforschung e.V.**

„...that what can be imagined can be achieved, that you must dare to dream, but that there's no substitute for perseverance and hard work and teamwork, because no one gets there alone...”

Dana Scully, The X-Files (Episode 4x18)

1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT	5
2.1. FUNKTIONEN VON ASTROZYTEN	5
2.1.1. Glutamat und Astrozyten	8
2.1.2. Virusinfektionen und Astrozyten	12
2.2. ARTEN VON ZELLTOD	14
2.2.1. Apoptose	14
2.2.2. Caspase-unabhängiger PARP1- und AIF-vermittelter Zelltod (Parthanatos).....	17
2.2.3. Nekrose.....	18
2.2.4. Nekroptose	19
2.2.5. Autophagie	20
2.3. TUMOR-NEKROSE-FAKTOR UND SEINE FUNKTIONEN IM GEHIRN	22
2.3.1. TNF und Zelltod	25
2.3.2. TNF und Epilepsie	26
2.4. EPILEPSIE UND NEUROINFLAMMATION	27
2.4.1. Epilepsie und Zelltod	29
2.4.2. Virale Enzephalitiden als Auslöser für Epilepsie	30
2.5. BORNA DISEASE VIRUS	31
2.5.1. <i>Borna disease virus</i> und Bornasche Erkrankung	31
2.5.2. <i>Borna disease virus</i> und Epilepsie	37
3. MATERIAL UND METHODEN	39
3.1. <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNGEN	39
3.1.1. Mäuse	39
3.1.1.1. TNF-transgene (TNF-tg) Mäuse und nicht-transgene Wildtyp (wt)-Mäuse....	39
3.1.1.2. TNF-Rezeptor-1- <i>knockout</i> (TNFR1ko)- und TNF-Rezeptor-2- <i>knockout</i> (TNFR2ko)-Mäuse	40
3.1.1.3. Analyse des transgenen Status der TNF-transgenen Mäuse mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR)	41
3.1.1.4. Analyse des transgenen Status der TNF-Rezeptor- <i>knockout</i> -Mäuse mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	43
3.1.2. Herstellung der Virussuspension und der Mock-Gehirnsuspension	45
3.1.3. Versuchsdurchführung und Versuchsablauf des <i>Borna disease virus</i> 1 (BoDV-1)- Infektionsversuchs.....	46
3.1.3.1. <i>Borna disease virus</i> 1 (BoDV-1)- und Mock-Infektion	47
3.1.3.2. Euthanasie und Probengewinnung.....	48
3.1.4. Histopathologische Untersuchungen	49
3.1.4.1. Hämatoxylin/Hämalaun und Eosin (H&E)-Färbung.....	49
3.1.4.2. Histopathologische Auswertung	49
3.1.5. Immunhistologische Untersuchungen	50
3.1.5.1. Antikörper, Seren und Kontrollen	51
3.1.5.2. Immunhistologie-Protokoll	52
3.1.5.3. Immunhistologische Auswertung.....	54
3.1.6. Statistische Auswertung	56
3.2. <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGEN	57
3.2.1. Präparation primärer kortikaler Astrozyten.....	57
3.2.2. <i>Borna disease virus</i> 1 (BoDV-1)-Infektion von Astrozyten.....	59
3.2.3. Kontrolle der BoDV-1-Infektion und der Reinheit der Astrozytenkulturen	59
3.2.4. Versuchsaufbau MTT-Assay.....	59
3.2.4.1. Behandlung der Astrozyten mit TNF und Glutamat	60
3.2.4.2. Durchführung des MTT-Assays.....	62

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.4.3. Auswertung und Statistik.....	62
3.2.5. Immunfluoreszenz	62
3.2.5.1. Antikörper und Seren	63
3.2.5.2. Immunfluoreszenz-Protokoll	64
3.2.5.3. Immunfluoreszenz-Auswertung	65
4. ERGEBNISSE.....	67
4.1. <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	67
4.1.1. Klinische Symptome	67
4.1.2. Histopathologie.....	69
4.1.2.1. Entzündliche und degenerative Veränderungen	70
4.1.2.2. Astrozytenaktivierung	76
4.1.3. Immunhistologische Nachweise von BoDV-N, GFAP, GLT1, GLAST, aktivierter Caspase 3 und AIF	81
4.1.3.1. Nachweis des BoDV-1-Nukleoproteins (BoDV-N)	81
4.1.3.2. Nachweis des <i>glial fibrillary acidic proteins</i> (GFAP).....	88
4.1.3.3. Nachweis der Glutamattransporter.....	93
4.1.3.3.1. Nachweis des Glutamattransporters 1 (GLT1)	93
4.1.3.3.2. Nachweis des Glutamat-Aspartat-Transporters (GLAST).....	99
4.1.3.4. Nachweis von Apoptose und des PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods ...	105
4.1.3.4.1. Nachweis von aktivierter Caspase 3	105
4.1.3.4.2. Nachweis des <i>apoptosis inducing factors</i> (AIF)	110
4.2. <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	117
4.2.1. MTT-Assay	117
4.2.1.1. Nicht infizierte Astrozyten.....	117
4.2.1.2. <i>Borna disease virus</i> 1 (BoDV-1)-infizierte Astrozyten	123
4.2.1.3. Vergleich nicht infizierter und BoDV-1-infizierter Astrozyten.....	128
4.2.1.4. Statistische Auswertung des MTT-Assays	131
4.2.2. Immunfluoreszenz-Ergebnisse	132
4.2.2.1. Nachweis des BoDV-1-Nukleoproteins (BoDV-N) und des <i>glial fibrillary acidic proteins</i> (GFAP).....	132
4.2.2.2. Nachweis des Glutamattransporters 1 (GLT1)	135
4.2.2.3. Nachweis von Apoptose, des PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods und von Autophagie	136
4.2.2.3.1. Nachweis von aktivierter Caspase 3	137
4.2.2.3.2. Nachweis des <i>apoptosis inducing factors</i> (AIF).....	139
4.2.2.3.3. Nachweis von <i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> (LC3 A/B).....	142
4.2.2.4. Nachweis der TNF-Rezeptoren	145
4.2.2.4.1. Nachweis des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1)	145
4.2.2.4.2. Nachweis des TNF-Rezeptors 2 (TNFR2).....	147
4.2.2.5. Nachweis des <i>proliferating cell nuclear antigens</i> (PCNA)	148
5. DISKUSSION	152
5.1. <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNGEN.....	153
5.1.1. Klinische Symptome	153
5.1.2. Entzündliche und degenerative Veränderungen und Nachweis von BoDV-N....	156
5.1.3. Astrozytenaktivierung und Nachweis von GFAP	161
5.1.4. Nachweis von GLT1 und GLAST	166
5.1.5. Nachweis von Zelltod	168
5.2 <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGEN	172
5.2.1. Nachweis von GFAP und BoDV-N in den Astrozytenkulturen	172
5.2.2. MTT-Assay	174

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.3. Nachweis von Zelltod in den Astrozytenkulturen.....	179
5.2.4. Nachweis von Proliferation in den Astrozytenkulturen	181
5.2.5. Nachweis von GLT1 und TNF-Rezeptoren in den Astrozytenkulturen	182
5.3. VERGLEICHENDE BERACHTUNG DER <i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i>	
UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	184
5.3.1. Astrozytärer Zelltod und Zellproliferation	184
5.3.2. Glutamatsystem.....	185
5.3.3. TNF-System	186
6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	188
6.1. ZUSAMMENFASSUNG	188
6.2. SUMMARY	193
7. LITERATURVERZEICHNIS	198
8. ANHANG	229
8.1. LÖSUNGEN UND PUFFER.....	229
8.1.1. Immunhistologie und Immunfluoreszenz.....	229
8.1.2. Glutamat- und TNF-Behandlung	229
8.1.3. MTT-Assay.....	230
8.2. BEZUGSQUELLEN	230
8.3. TABELLEN <i>IN VIVO</i> UNTERSUCHUNGEN.....	235
8.3.1. <i>Score Sheet</i> Mäuse	235
8.3.2. Tabelle entzündliche und degenerative Veränderungen und Astrozytenaktivierung	238
8.3.3. Tabelle Nachweis von BoDV-N.....	243
8.3.4. Tabelle Nachweis von GFAP	244
8.3.5. Tabelle Nachweis von GLT1.....	247
8.3.6. Tabelle Nachweis von GLAST	250
8.3.7. Tabelle Nachweis von aktivierter Caspase 3	253
8.3.8. Tabelle Nachweis von AIF	255
8.4. TABELLEN <i>IN VITRO</i> UNTERSUCHUNGEN	260
8.4.1. Tabelle MTT-Assay nicht infizierte Astrozyten	260
8.4.2. Tabelle MTT-Assay BoDV-1-infizierte Astrozyten	261
8.4.3. Tabelle Rohwerte (optische Dichte) MTT-Assay nicht infizierte und BoDV-1- infizierte Astrozyten	262
8.4.4. Tabelle GFAP und BoDV-N in Astrozytenkulturen	269
8.5. ABKÜRZUNGEN	270

1. EINLEITUNG

Epilepsie ist die dritthäufigste Störung des zentralen Nervensystems (ZNS) beim Menschen und die häufigste ZNS-Erkrankung beim Hund und ist charakterisiert durch wiederholte, anfallsartige Funktionsstörungen des Gehirns infolge exzessiver Entladungen von Neuronen (JACKSON, 1873; LICHT *et al.*, 2002; Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2011a). Gemäß der *International League Against Epilepsy* (ILAE) sind Krampfanfälle transient vorkommende Anzeichen und/oder Symptome aufgrund abnormer exzessiver oder synchroner neuronaler Aktivität im Gehirn (TRINKA *et al.*, 2015). Epilepsie wird u.a. definiert als mindestens zwei unprovizierte Krampfanfälle, welche im Abstand von über 24 Stunden voneinander auftreten (FISHER *et al.*, 2014). Der Status epilepticus ist definiert als ein Zustand, welcher entweder daraus resultiert, dass die Mechanismen zur Beendigung von Krampfanfällen versagen oder durch Initiation von Mechanismen, welche zu abnormen, verlängerten Krampfanfällen führen und welcher, abhängig von Typ und Dauer des Krampfanfalls, Langzeitkonsequenzen wie neuronalen Zelltod, neuronale Schädigungen sowie Veränderungen von neuronalen Netzwerken haben kann (TRINKA *et al.*, 2015). Neuronale Dysfunktionen, wie der Verlust von Neuronen, Neuerschaltungen von Neuronen oder Neurotransmitter und Neuropeptidveränderungen, spielen bei der Epileptogenese eine Rolle, wobei die Gliazell-vermittelte synaptische Modulation durch Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) hierbei eine wichtige Rolle spielt (SAVIN *et al.*, 2009; Übersicht bei PITKÄNEN and LUKASIUK, 2011). Bei vielen Epilepsieformen wurden auch erhöhte Mengen von Entzündungsmediatoren wie z.B. TNF, Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, Prostaglandin E2 (PGE2), eine Aktivierung der Complementkaskade sowie des IL-1-Rezeptors in den vom Anfallsgeschehen betroffenen ZNS-Regionen festgestellt (Übersicht bei SEIFERT *et al.*, 2010, VEZZANI *et al.*, 2011a und VEZZANI *et al.*, 2016b). Dies spricht dafür, dass Entzündungsreaktionen und das Immunsystem an der Entstehung und Aufrechterhaltung von epileptischen Anfällen/Krämpfen durch Förderung neuronaler Hyperexzitabilität beteiligt sind (Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2011a und VEZZANI *et al.*, 2016b). Modelle von ZNS-Infektionen haben gezeigt, dass bei bereits vorliegenden, entzündlichen Veränderungen eine erhöhte Prädisposition für epileptische Anfälle/Krämpfe vorliegt (FOTHERINGHAM *et al.*, 2007; KRAMER *et al.*, 2012; Übersicht bei GETTS *et al.*, 2008, MICHAEL and SOLOMON, 2012, THEODORE *et al.*, 2008, VEZZANI *et al.*, 2011a und VEZZANI *et al.*, 2016a). Bis zu 50 % der Menschen mit Virusinfektionen des ZNS (z.B. *Herpesviridae*, *Flaviviridae*) entwickeln Krämpfe, sowohl während der Infektion, als auch erst Jahre später, was die *Trigger*-Funktion von Viren belegt (ELBERS *et al.*, 2007; Übersicht bei GETTS *et al.*, 2008, MICHAEL and SOLOMON, 2012, MISRA *et al.*, 2008 und THEODORE *et al.*, 2008). Viren werden auch als Ursache für

therapieresistente Temporallappenepilepsie vermutet (FOTHERINGHAM *et al.*, 2007; LEIBOVITCH and JACOBSON, 2015). Umgekehrt können epileptische Anfälle/Krämpfe durch Zytokinfreisetzen bereits *per se* Entzündungsreaktionen im Gehirn auslösen. Man weiß heute jedoch, dass neben neuronalen Dysfunktionen insbesondere auch astrozytäre Dysfunktionen bei der Epileptogenese eine große Rolle spielen. Die Rolle von astroglialen Dysfunktionen bei der Epileptogenese wird z.B. dadurch belegt, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF oder IL-1 zuerst in aktivierten Astrozyten und Mikroglia exprimiert werden (Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2011a). Das in dieser Arbeit besonders beleuchtete Zytokin TNF besitzt sowohl proapoptotische, prokonvulsive und neurodegenerative Effekte, welche v.a. über den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1) vermittelt werden, als auch neuroprotektive, antikonvulsive Effekte, welche v.a. über den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 (TNFR2) mit Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB) vermittelt werden, wobei es auch Überlappungen der Signalwege gibt (FONTAINE *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2004; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Eine Überexpression von NFkB tritt bei humanen Epilepsieformen mit hippocampaler Sklerose in den dortigen aktivierten Astrozyten auf (CRESPEL *et al.*, 2002). Weiterhin sind Astrozyten an vielen wichtigen Prozessen im ZNS beteiligt. Sie bilden über *gap junctions* Netzwerke und haben wichtige homöostatische Funktionen (SIPE and MOORE, 1976; TANI *et al.*, 1973; Übersicht bei VERKHRATSKY and PARPURA, 2010). Astrozyten interagieren mit Synapsen, indem sie Neurotransmitter wie Glutamat aus dem synaptischen Spalt aufnehmen, gleichzeitig können sie aber auch Ca^{2+} -rezeptorvermittelt Gliatransmitter wie z.B. Glutamat freisetzen und so die neuronale Erregbarkeit modulieren (sog. „*Tripartite Synapse*“) (Übersicht bei ARAQUE *et al.*, 1999 und SEIFERT *et al.*, 2010). Die Induktion von reaktiver Astroglie blockiert u.a. inhibitorische Synapsen und bewirkt damit eine Störung im Glutamin-Zyklus zu Gunsten der exzitatorischen Synapsen (ORTINSKI *et al.*, 2010). Aktivierte/reaktive Astrozyten, wie sie z.B. auch bei Virusinfektionen des Gehirns auftreten, haben veränderte Gen- und Zytokinexpressionen und damit auch veränderte pro- oder anti-inflammatorische Funktionen, z.B. werden die Glutamatrezeptoren aufreguliert und es wird vermehrt TNF abgegeben, was die astrozytäre Glutamatfreisetzung und die Hyperexzitabilität in den betroffenen Arealen erhöht (JANG *et al.*, 2013; ORTINSKI *et al.*, 2010; Übersicht bei WETHERINGTON *et al.*, 2008). Durch erhöhte TNF-Konzentrationen kommt es auch zur Beeinflussung von Glutamattransportern und zur Hemmung der Glutamin-Synthetase in Astrozyten, was die Glutamataufnahme hemmt und so zu Hyperexzitabilität und Glutamattoxizität bei den Neuronen führen kann (CARMEN *et al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2010). Die Astrozytendysfunktionen bei epileptischen Krämpfen können in geeigneten Tiermodellen untersucht werden. Hierbei sollte v.a. die Kombination prädisponierender Zytokinwirkungen zusammen mit der *Trigger*-Funktion von Virusinfektionen des ZNS untersucht werden, da über

die kombinierten Effekte von Virusinfektionen bei gleichzeitig vorliegenden, veränderten Zytokinspiegeln (insbesondere TNF) auf astrozytäre Veränderungen mit daraus resultierenden Krampfanfällen noch wenig bekannt ist. Hierfür wurden in dieser Arbeit mehrere Mausmodelle verwendet: TNF-transgene Mäuse mit moderater neuronaler TNF-Überexpression sowie TNFR1*knockout* (ko)- bzw. TNFR2ko-Mäuse (im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen), welche mit *Borna disease virus 1* (BoDV-1) infiziert wurden. Das neurotrope BoDV-1 gehört mit den jüngst entdeckten aviären Bornaviren (ABV) und dem *variegated squirrel 1 bornavirus* (VSBV-1) zu der Familie der *Bornaviridae* aus der Ordnung der *Mononegavirales* (AFONSO *et al.*, 2016; HOFFMANN *et al.*, 2015; KUHN *et al.*, 2014). Das neurotrope Virus stellt aufgrund seiner biologischen Eigenschaften ein sehr geeignetes Modellsystem dar, da es eine T-Zell-vermittelte, nicht-eitrige Meningoenzephalitis mit Viruspersistenz induziert (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). TNF spielt als pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin sowohl in der Früh-, als auch in der Spätphase der BoDV-1-Infektion von Ratten, Mäusen und vermutlich auch Pferden eine große Rolle (SCHAUDIEN, 2007). Nach experimenteller BoDV-1-Infektion von Mäusen mit moderater neuronaler TNF-Überexpression kommt es zu einer ungewöhnlich starken Hypertrophie von Astrozyten mit vergrößerten, degeneriert-erscheinenden Zellkernen und spontan auftretenden epileptischen Krämpfen (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Daher eignet sich dieses auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell, welches die Effekte erhöhter Zytokinlevel mit einer Virusinfektion kombiniert, gut zum Erforschen der Entstehung von epileptischen Krämpfen und möglicher verschiedener *Trigger*. Bei diesem Modellsystem wird v.a. natives TNF und beide TNF-Rezeptoren sowie IL-1, IL-6 und Interferon γ (IFN γ) aufreguliert, was wesentlich für die spontanen Krämpfe dieser Tiere sein dürfte (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Zur Charakterisierung der astrozytären Veränderungen und der Rolle des TNF- und Glutamatsystems, wurden neben diesem *in vivo* Modell in der hier vorliegenden Arbeit auch TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse verwendet. Zusätzlich sollten diese kombinierten Effekte an einem *in vitro* Modell nachempfunden werden. Hierfür wurden primäre kortikale Astrozyten aus den oben genannten Mausstämmen mit BoDV-1 infiziert und mit TNF und/oder Glutamat behandelt und insbesondere im Hinblick auf Zelltod, Zellproliferation und Zellaktivierung untersucht. Nach BoDV-1-Infektion tritt in den TNF-transgenen Mäusen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, eine signifikant stärkere, nicht-eitrige Meningoenzephalitis mit korrespondierender Mikroglia- und Astrozytenaktivierung auf, vorwiegend in den TNF-exprimierenden Arealen Cortex cerebri, Hippocampus, Striatum und Thalamus, nicht jedoch im Ammonshorn (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Die Astrozyten mit ungewöhnlich starker Hypertrophie zeigten morphologische Anzeichen ähnlich derer, wie sie bei Apoptose zu sehen sind (Anzeichen von Kernwandhyperchromasie), erwiesen sich jedoch als aktivierte Caspase 3-negativ, was gegen das Vorliegen von Apoptose spricht

(KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Diese morphologischen Veränderungen der Astrozyten sind wahrscheinlich Teil von funktionellen Veränderungen, welche an der progredienten Entwicklung der epileptiformen Krämpfe nach BoDV-1-Infektion wesentlich beteiligt sein dürften. Das Fehlen einer Caspase 3-Aktivierung in den veränderten Astrozyten kann z.B. für alternative Zelluntergangsformen evtl. in Verbindung mit verändertem Glutamatstoffwechsel sprechen oder für eine bisher nicht bekannte Form der reaktiven Astroglie im Sinne einer (proinflammatorischen oder anti-inflammatorischen) phänotypischen Polarisierung (JANG *et al.*, 2013). Alternative Zelluntergangsformen zur Apoptose, dem klassischen, programmierten Zelltod, sind beispielsweise Autophagie, welche auch bei Epilepsie eine Rolle spielt, der Caspase-unabhängige, über mitochondriale Freisetzung und nukleäre Translokation des *apoptosis inducing factors* (AIF) laufende, Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP1)-gesteuerte Zelltod (Parthanatos) sowie die *receptor interacting protein kinase 1/3* (RIP 1/3)-Komplex-abhängige und unter anderem durch TNFR1 initiierte programmierte Nekrose (Nekroptose) (CHO *et al.*, 2009; CULMSEE *et al.*, 2005; MCMAHON *et al.*, 2012).

Die möglichen Ursachen der an dem oben genannten Mausmodell gezeigten astrozytären Veränderungen und möglicherweise damit einhergehenden astrozytären Dysfunktionen sollten in der hier vorliegenden Arbeit an (weiteren) *in vivo* und *in vitro* Modellen näher charakterisiert werden. Hierbei sollte insbesondere auch untersucht werden, welche Rolle das TNF- und Glutamatssystem dabei spielen und welchen Einfluss die TNF-Rezeptoren und Glutamattransporter dabei haben.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. FUNKTIONEN VON ASTROZYTEN

Astrozyten, erstmals von Michael von Lenhossék benannt, sind neuroektodermaler Herkunft und stellen die größte Zellpopulation im Gehirn dar (VON LENHOSSÉK, 1891). Sie gehören gemeinsam mit den Oligodendrozyten zu den sogenannten Makroglia (Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015). Der Name Astrozyt stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Sternzelle“, was auf ihre sternförmig verzweigte Form hinweist. Früher waren Astrozyten lediglich als Stützzellen im Gehirn bekannt, doch heute weiß man, dass sie viele weitere Funktionen erfüllen und miteinander in Netzwerken über *gap junctions* (vor allem Connexin 43) gekoppelt sind (SIPE and MOORE, 1976; TANI *et al.*, 1973; Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015). Sie sind für die physiologische Homöostase im Gehirn zuständig, indem sie für ein konstantes Mikromilieu sorgen. Ferner sind sie an Genese, Auf- und Umbau von Synapsen u.a. durch Expression von Thrombospondinen beteiligt und können am synaptischen Spalt auch Transmitter aufnehmen und sogenannte Gliotransmitter (u.a. Glutamat, D-Serin, Adenosintriphosphat [ATP]) zur Kommunikation mit anderen Astrozyten und Neuronen abgeben, weshalb sich auch der Name „*Tripartite Synapse*“ (präsynaptisches Neuron, postsynaptisches Neuron und Astrozyt) etabliert hat (CHOI *et al.*, 2012; CHRISTOPHERSON *et al.*, 2005; Übersicht bei ARAQUE *et al.*, 1999, PAPA *et al.*, 2014 und VERKHRATSKY and PARPURA, 2010). Astrozyten sind weiterhin an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke durch die sogenannte *glia limitans* beteiligt, welche durch astrozytäre Endausläufer gebildet wird und regulieren dadurch auch den zerebralen Blutfluss (BECHMANN *et al.*, 2007; Übersicht bei GIMSA *et al.*, 2013 und VANDEVELDE *et al.*, 2012). Astrozyten produzieren neurotrophische Faktoren, wie z.B. *glial cell-line derived neurotrophic factor* (GDNF) oder *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF), welche während der fetalen Gehirnentwicklung beim Wachstum von Neuronen als eine Art Führungsschiene (sog. radiale Glia) und später bei der Differenzierung und dem Schutz von Neuronen eine Rolle spielen (BRAMBILLA *et al.*, 2016; PETROVA *et al.*, 2003; TAVERNA *et al.*, 2014; Übersicht bei VANDEVELDE *et al.*, 2012 und VINTERS *et al.*, 2015). Adulte Astrozyten können sich in Kultur unter Zusatz von embryonalen Gehirnextrakten wieder in radiale Glia zurückverwandeln, aber auch selbst als neuronale Vorläuferzellen fungieren (GOLDMAN, 2003; HUNTER and HATTEN, 1995; Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015). Weiterhin haben Astrozyten immunregulatorische Funktionen, indem sie auf verschiedene Stimuli mit der Abgabe von Immun- und Entzündungsmediatoren reagieren können und spielen im Gehirnstoffwechsel sowie in der energetischen Versorgung von Neuronen, z.B. durch Glutamat-stimulierte Glykolyse und

Laktatbildung (sog. „Astrozyt-Neuron-Laktat-*Shuttle*“), der Zell-zu-Zell-Kommunikation, bei der Entgiftung von Ammoniak und bei oxidativem Stress sowie bei Narbenbildung und Reparaturvorgängen eine wichtige Rolle (CHOI *et al.*, 2012; DRINGEN *et al.*, 1999; PELLERIN and MAGISTRETTI, 1994; PETROVA *et al.*, 2003; Übersicht bei FARINA *et al.*, 2007, PAPA *et al.*, 2014, VANDEVELDE *et al.*, 2012 und VERKHRATSKY and PARPURA, 2010). Über Aquaporine (insbesondere Aquaporin 4) und Kaliumkanäle kontrollieren sie auch den Wasserhaushalt und extrazellulären Kaliumgehalt im Gehirn (Übersicht bei POTOKAR *et al.*, 2016; VERKHRATSKY and PARPURA, 2010 und VINTERS *et al.*, 2015). Es gibt verschiedene Formen und Typen von Astrozyten, von welchen die protoplasmatischen Astrozyten (Typ I Astrozyten, Abb. 1A), welche vor allem in der grauen Substanz vorkommen, die häufigsten sind (MILLER and RAFF, 1984; Übersicht bei SOFRONIEW and VINTERS, 2010). Sie bilden ein Netzwerk aus fein verzweigten Fortsätzen im Neuropil, stehen in engem Kontakt mit Synapsen und ihre Endausläufer umschlingen Blutgefäße und bilden so die *membrana limitans* der Blut-Hirn-Schranke (MILLER and RAFF, 1984; Übersicht bei SOFRONIEW and VINTERS, 2010). Weiterhin gibt es die fibrösen/fibrillären Astrozyten (Typ II Astrozyten, Abb. 1B), welche in der weißen Substanz vorkommen und viele lange faserartige Fortsätze besitzen, sowie die nur bei Menschen und Primaten beschriebenen polarisierten Astrozyten in tiefen kortikalen Schichten nahe der weißen Substanz und die interlaminären Astrozyten, welche in der obersten/ersten Cortexschicht vorkommen (OBERHEIM *et al.*, 2006; Übersicht bei SOFRONIEW and VINTERS, 2010). Eine weitere besondere Form von Astrozyten stellen die Bergmann-Gliazellen dar, welche nur im Kleinhirn um die Purkinje-Zellschicht herum vorkommen und deren Fortsätze bis zur Pia mater reichen, wo sie die *membrana limitans gliae superficialis* bilden (HERNDON, 1964).

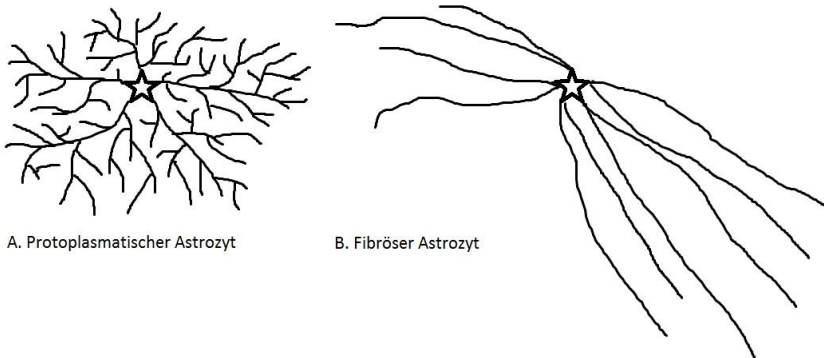


Abb. 1: Typen von Astrozyten

A: Protoplasmatischer oder Typ I Astrozyt mit Netzwerk aus fein verzweigten Fortsätzen
B: Fibröser oder Typ II Astrozyt mit vielen langen faserartigen Fortsätzen

Astrozyten reagieren schnell auf Verletzungen und Erkrankungen inklusive Virusinfektionen mit strukturellen und funktionellen Veränderungen, welche man reaktive Astrogliose nennt (EDDLESTON and MUCKE, 1993; MUCKE *et al.*, 1991; ZLOTNIK, 1968). Dieser Prozess geht mit Veränderungen in Genexpressionen (sowohl Auf- als auch Abregulation) einschließlich einer Aufregulation des astrozytären Intermediärfilaments *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), zellulärer Hypertrophie und, je nach Ausmaß, auch mit astrozytärer Proliferation und Überlappen von benachbarten Astrozytenfortsätzen einher (OBERHEIM *et al.*, 2008; Übersicht bei ANDERSON *et al.*, 2014). Dies konnte z.B. auch an Mausmodellen für Epilepsie gezeigt werden, in welchen die Überlappung der Astrozytenfortsätze um das 10-fache zunahm (OBERHEIM *et al.*, 2008). Morphologisch sind zwei reaktive Astrozytenformen beschrieben: der Gemistozyt (gemistozytäre Astrozyt), welcher bei akuten Schädigungen auftritt und durch ein stark vergrößertes, homogen eosinophiles Perikaryon mit multiplen dicken, kurzen Fortsätzen gekennzeichnet ist und der Astrozyt, der bei chronischen Veränderungen zur Form des fibrillären Astrozyts mit vielen dünnen, langen GFAP-positiven Zellfortsätzen transformiert (Übersicht bei VANDEVELDE *et al.*, 2012). Daneben gibt es noch spezielle Arten von reaktiven Astrozyten, wie die Alzheimer Typ II Zellen, welche vergrößerte helle, vesikuläre Nuklei mit an den Rand gedrängtem Chromatin und wenig Zytoplasma haben, kaum GFAP exprimieren und bei metabolischen Enzephalopathien (bei Leber- oder seltener auch Nierenerkrankungen) in Gruppen in der grauen Substanz zu finden sind (Übersicht bei ELLISON *et al.*, 2013 und VANDEVELDE *et al.*, 2012). Die sogenannten Rosenthal-Fasern sind eosinophile Einschlüsse (Proteinaggregate) in Fortsätzen von fibrillären Astrozyten, welche bei chronischer, langanhaltender reaktiver Astrogliose, bei neoplastischen Proliferationen sowie bei der Alexander-Krankheit (fibrinoide Leukodystrophie) auftreten (Übersicht bei ELLISON *et al.*, 2013, VINTERS *et al.*, 2015 und VANDEVELDE *et al.*, 2012). Der *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) spielt eine kritische Rolle bei der Regulation von reaktiver Astrogliose und Aufregulation von GFAP (HERRMANN *et al.*, 2008). Die GFAP-Expression nimmt auch mit zunehmender Reifung der Astrozyten zu (AHLEMEYER *et al.*, 2013; BRAMANTI *et al.*, 2010; MANZANO *et al.*, 2007). Eine reaktive Astrogliose ist jedoch eine heterogene, unspezifische Reaktion und führt je nach ursächlichem Stimulus und Signalweg zu unterschiedlicher Morphologie und Genexpression, was sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Effekte haben kann (HAMBY *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2013; MEEUWSEN *et al.*, 2003; PANG *et al.*, 2001; ZAMANIAN *et al.*, 2012; Übersicht bei ANDERSON *et al.*, 2014 und SOFRONIEW, 2009). Ähnlich wie Mikroglia, zeigen auch in Kultur gehaltene aktivierte/reaktive Astrozyten zwei funktionelle Phänotypen (auch funktionelle Polarisierung genannt): zum einen die klassische Aktivierung mit Aufregulation von proinflammatorischer Genexpression wie z.B. von TNF, bei welcher das akute Phase Protein Lipocalin 2 (LCN2) als autokriner Promotor eine kritische Rolle spielt, zum anderen die alternative Aktivierung mit

Aufregulation von anti-inflammatorischer Genexpression wie z.B. von Arginase 1 (JANG *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2009). Im Gegensatz zur neurotoxisch wirkenden, klassischen Aktivierung, schützt die alternative Astrozytenaktivierung Neurone vor Glutamatexzitotoxizität und oxidativem Stress (JANG *et al.*, 2013). Aus Untersuchungen an primären humanen Astrozyten weiß man, dass TNF zu den 20 meist exprimierten Genen von Astrozyten gehört (MEEUWSEN *et al.*, 2003). Die Behandlung von Astrozyten mit TNF führt zur Aufregulation von verschiedenen Genen, wie CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2) (zuständig für Chemotaxis, z.B. von Leukozyten über die Blut-Hirn-Schranke), *bone morphogenetic protein 2a* (BMP-2a) und BMP-3 (Mediatoren in der Neuralentwicklung), *corticotropin-releasing factor receptor 1* (neuromodulatorischer Hormonrezeptor), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neuromodulin (neuroprotektiver Faktor), *Interferon-regulatory factor* (Transkriptionsfaktor der die Interferonantwort reguliert), Calcitonin-Rezeptor, CCL5 (chemotaktischer Faktor) und Rezeptorprotein-Tyrosinkinase (MEEUWSEN *et al.*, 2003). Außerdem induziert die TNF-Behandlung unter anderem auch die gesteigerte Expression von TNFR1 und TNFR2 in Astrozyten (MEEUWSEN *et al.*, 2003). Letztendlich bestimmen komplexe Interaktionen zwischen Astrozyten, Mikroglia und infiltrierenden Lymphozyten und damit einhergehende, unterschiedliche Zytokinlevel (unter anderem von TNF) das Mikroumfeld im Gehirn und somit (neuronale) Funktionen und Dysfunktionen (Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015).

2.1.1. Glutamat und Astrozyten

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS und wirkt in zu hohen Konzentrationen neurotoxisch (Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015). Die extrazelluläre Konzentration von Glutamat im Gehirn liegt normalerweise bei etwa 2 μM , wohingegen die zytosolischen Konzentrationen abhängig vom Zelltyp bei 1 – 10 mM liegen (Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015). Durch die Glutamatdecarboxylase kann in Neuronen Glutamat in den inhibitorischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) umgewandelt werden. Die häufigsten Glutamattransporter sind der Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST, auch als *excitatory amino acid transporter 1*, EAAT1 bekannt) und der Glutamattransporter 1 (GLT1, auch als EAAT2 bekannt), welche fast ausschließlich in Astrozytenmembranen vorkommen und hauptverantwortlich dafür sind, extrazelluläres Glutamat im ZNS aus dem synaptischen Spalt zu entfernen und dadurch Exzitotoxizität zu verhindern sowie die synaptische Übertragung zu regulieren (CHOI *et al.*, 1987; HUANG and BERGLES, 2004; REGAN *et al.*, 2007; ROTHSTEIN *et al.*, 1996; ROTHSTEIN *et al.*, 1994). Vom GLT1 existieren C-terminale *splice*-Varianten, GLT1a und GLT1b, welche durch TNF unterschiedlich reguliert werden, wobei es bei GLT1a nur zu einer transienten, bei GLT1b jedoch zu einer anhaltenden TNF-vermittelten Aufregulation in primären Astrozytenkulturen kommt (FOCANT *et al.*, 2011). Astrozyten stellen mit etwa 80 % die Hauptaufnahmequelle von Glutamat im Gehirn dar,

lediglich 20 % wird von postsynaptischen Neuronen aufgenommen (Übersicht bei PAPA *et al.*, 2014 und VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). Dysfunktionen dieser Transporter spielen daher eine Rolle bei neuroinflammatorischen/infektiösen und neurodegenerativen Erkrankungen. Beispielsweise ist GLT1 nach Behandlung organotypischer *Slice*-Kulturen aus dem Rückenmark von Ratten mit neuroadaptiertem Sindbis Virus (NSV) herunterreguliert und auch bei amyotropher lateraler Sklerose (ALS) stark vermindert (CARMEN *et al.*, 2009; ROTHSTEIN *et al.*, 1995). Außerdem zeigen GLT1-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für kortikale Schäden sowie spontan auftretende, letale epileptische Krämpfe (TANAKA *et al.*, 1997). Glutamat selbst kann die Oberflächendiffusion von GLT1 auf Astrozytenmembranen erhöhen (AL AWABDH *et al.*, 2016). Bei sehr hohen Glutamatkonzentrationen kann es auch zu einer erhöhten Anzahl reaktiver Astrozyten mit gesteigerter Expression von GFAP und S100 β -Protein sowie Hypertrophie und Proliferation der Astrozyten kommen (KRAWCZYK *et al.*, 2015). Das aufgenommene Glutamat kann in den Astrozyten schnell durch die Glutamin-Synthetase in Glutamin umgewandelt werden, welches nicht neurotoxisch ist und in dieser Form wieder zurück über den synaptischen Spalt in die präsynaptischen Neurone transportiert wird, wo es erneut als Quelle für die Glutamatherstellung dient (Abb. 2) (CHOI *et al.*, 1987; Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). Durch die Hemmung der Glutamin-Synthetase wird die astrozytäre Glutamataufnahme und Glutaminabgabe vermindert (ZOU *et al.*, 2010). Beispielsweise inhibiert TNF die Glutamataufnahme in Astrozyten, indem es die Glutamin-Synthetase-Expression reduziert und die Glutamat-induzierte Aktivierung hemmt (Abb. 3) (FINE *et al.*, 1996; ZOU *et al.*, 2010). Astrozyten können aber auch zum Zwecke interzellulärer (glia-neuronaler oder glia-gliale) Kommunikation Glutamat durch regulierte Exozytose abgeben, was durch eine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration ausgelöst wird (Abb. 2) und die Anwesenheit konstitutiver Level (im picomol-Bereich) von TNF benötigt (Abb. 3) (BEZZI *et al.*, 2004; SANTELLO *et al.*, 2011). TNF beeinflusst in diesem Zusammenhang die Ankopplungsgeschwindigkeit von glutamathaltigen Vesikeln in Astrozyten mit der Zellmembran und damit die astrozytäre Exozytose von Glutamat, welche ohne TNF deutlich verlangsamt ist (Abb. 3) (SANTELLO *et al.*, 2011). Das dadurch nur langsam und asynchron abgegebene Glutamat wird so frühzeitig durch Glutamattransporter abgefangen, was zu einem Überwiegen der Glutamataufnahme führt (SANTELLO *et al.*, 2011). Daher kommt es nicht zur Stimulation präsynaptischer, die Untereinheit NR2B enthaltener N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren und eine Verstärkung exzitatorischer synaptischer Aktivität, wie sie in Anwesenheit von TNF stattfinden würde, bleibt aus (SANTELLO *et al.*, 2011). Höhere Konzentrationen von TNF wiederum (im nanomolar Bereich) verstärken die Glutamatabgabe von Astrozyten (BEZZI *et al.*, 2001; SANTELLO *et al.*, 2011). Eine Beeinträchtigung des Glutamat-Glutamin-Zyklus (Abb. 2, 3) tritt bei vielen ZNS-Erkrankungen wie Epilepsie, der Parkinsonschen und Alzheimerschen Krankheit, Schlaganfall oder traumatischen

Verletzungen auf (ORTINSKI *et al.*, 2010). Bei der Temporallappenepilepsie (TLE) liegt ein segmentaler Neuronenverlust und reaktive Astrogliose in der *Cornu ammonis* 1 (CA1)- und CA2-Region sowie im Hilus dentatus des Hippocampus vor mit verminderter Expression der Glutamin-Synthetase sowie von GLAST und GLT1 im Hippocampus (EID *et al.*, 2004). In einem Mausmodell für TLE konnte initial (ein Tag) nach Status epilepticus eine signifikante Aufregulation von GLT1 im Hippocampus festgestellt werden, auf welche eine deutliche Abregulation vier und sieben Tage nach Status epilepticus folgte (HUBBARD *et al.*, 2016). Mit 30 Tagen nach Status epilepticus war die GLT1-Expression vergleichbar mit Kontrollwerten (HUBBARD *et al.*, 2016). Bei TLE ist der *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg in Astrozyten in epileptischen Foci aktiviert und die Deletion von mTOR in reaktiven Astrozyten vermindert die Krampf-Häufigkeit *in vivo* (WANG *et al.*, 2016). Außerdem fördert die Inhibition von mTOR die GLT1-Stabilität und damit die Glutamataufnahme von Astrozyten *in vitro* (WANG *et al.*, 2016).

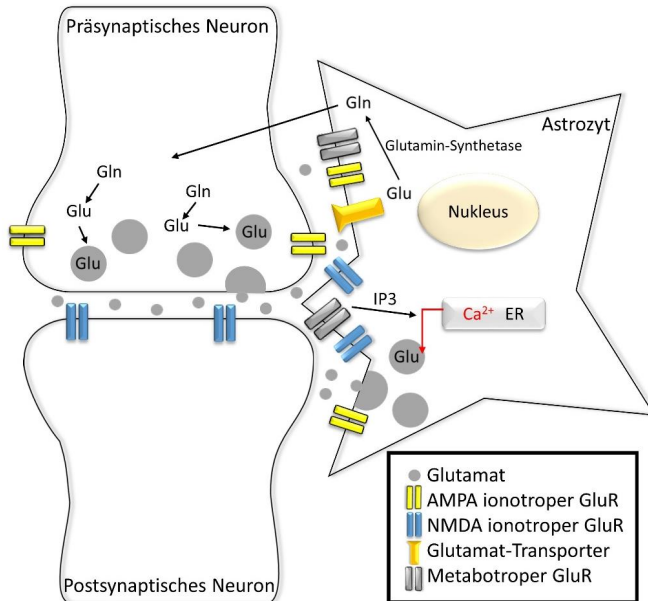


Abb. 2: „Tripartite Synapse“ und Glutamat-vermittelte neurogliale Kommunikation (modifiziert nach Verkhratsky und Kirchhof 2007)

AMPA: *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid*; ER: endoplasmatisches Retikulum; Gln: Glutamin; Glu: Glutamat; GluR: Glutamatrezeptor; IP3: Inositoltriphosphat; NMDA: N-methyl-D-aspartat

Glutamat wird zum Großteil durch Glutamattransporter auf Astrozyten aus dem synaptischen Spalt aufgenommen und in Astrozyten durch die Glutamin-Synthetase in Glutamin umgewandelt, welches wieder zurück in präsynaptische Neurone gelangt, wo es wieder in den exzitatorischen Transmitter Glutamat umgewandelt werden kann (sog. „Glutamat-Glutamin-Shuttle“). Durch die Aktivierung von astrozytären metabotropen Glutamatrezeptoren kommt es über IP3-Synthese auch zur Abgabe von Ca^{2+} aus dem ER, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt und wiederum eine astrozytäre Glutamat-Exozytose bedingt.

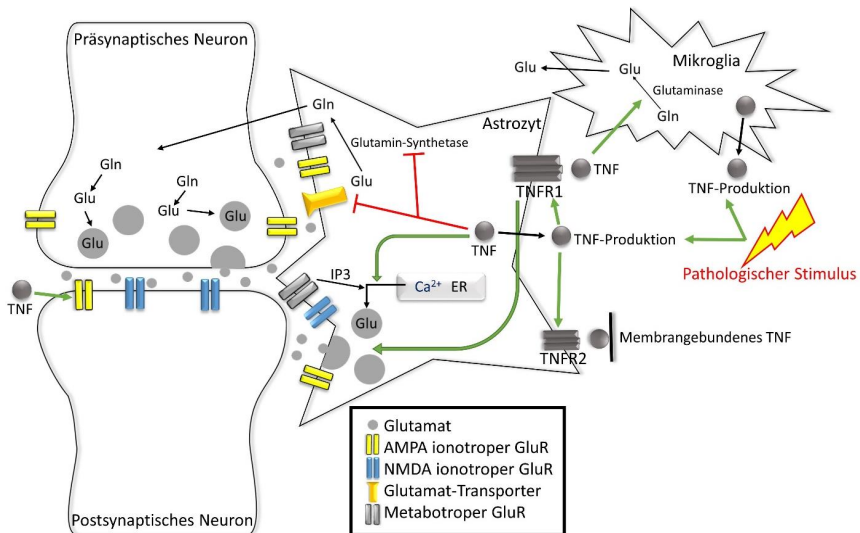


Abb. 3: Wechselwirkungen zwischen TNF und Glutamat im ZNS (modifiziert nach Verkhratsky und Kirchhof 2007)

AMPA: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid; ER: endoplasmatisches Retikulum; Gln: Glutamin; Glu: Glutamat; GluR: Glutamatrezeptor; IP3: Inositoltriphosphat; NMDA: N-methyl-D-aspartat; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; TNFR: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor

TNF wird konstitutiv von Astrozyten und Mikroglia gebildet. Durch pathologische Stimuli und damit einhergehender reaktiver Astro- und Mikroglieose kommt es zu einer deutlichen Steigerung der TNF-Produktion, was zu neuronaler Glutamatexzitotoxizität führen kann: Astrozyten exprimieren überwiegend TNFR1, jedoch wird die Expression von TNFR1 und TNFR2 u.a. durch TNF selbst erhöht. TNF steigert die Anknüpfungsgeschwindigkeit glutamathaltiger Vesikel und folglich die Glutamatexozytose in Astrozyten, was über den TNFR1 vermittelt ist. TNF wird auch für die dafür nötige Erhöhung zytosolischer Ca^{2+} -Level benötigt. In Mikroglia steigert TNF die Glutaminaseaktivität und kann so auch die mikrogliale Glutamatfreisetzung fördern. Weiterhin führt TNF zur Aufregulation postsynaptischer neuronaler AMPA-Rezeptoren an exzitatorischen Synapsen und steigert so deren Effizienz. Die astrozytäre Glutamataufnahme wird durch TNF gehemmt, indem TNF die astrozytären Glutamattransporter herunterreguliert und die Glutamin-Synthetase hemmt.

2.1.2. Virusinfektionen und Astrozyten

Auch Virusinfektionen des Gehirns führen zu einer reaktiven Astroglieose (ZLOTNIK, 1968). Studien haben gezeigt, dass Astrozyten die Hauptproduzenten von Interferon β (IFN β), einem wichtigen antiviralen Zytokin der zellulären angeborenen Immunität, nach Virusinfektionen des Gehirns sind (PFEFFERKORN *et al.*, 2015). Sie können dadurch sogar vor letalen Enzephalitiden schützen, wie am Beispiel von intranasalen Vesikulären-Stomatitis-Virus-Infektionen bei Mäusen gezeigt werden konnte (DETJE *et al.*, 2015; PFEFFERKORN *et al.*, 2015). Am Beispiel des *Japanese encephalitis virus* konnte gezeigt werden, dass infizierte

Astrozyten durch Abgabe von Interleukin 6 (IL-6) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zur Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke beitragen (CHANG *et al.*, 2015). Die Infektion mit NSV (Alphavirus) führt zu fulminanter Enzephalomyelitis in empfänglichen Mäusen, einhergehend mit Zelltod von Motoneuronen (CARMEN *et al.*, 2009). Dies steht mit TNF-abhängiger Herunterregulation von GLT1 im Zusammenhang, da TNF-defiziente NSV-infizierte Mäuse eine deutlich verminderte Mortalität ohne GLT1-Verminderung und neuronalen Zelltod aufweisen (CARMEN *et al.*, 2009). Andere Virusinfektionen wie z.B. mit humanem Herpesvirus 6A, Enterovirus 71 oder St. Louis-Enzephalitis-Virus können, bei letzterem stark abhängig von der Infektionsdosis, auch zu astrozytärer Apoptose führen (GU *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015; ZUZA *et al.*, 2016). Nach Herpesvirus 6A-Infektion sind hierfür sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Apoptosewege beschrieben (GU *et al.*, 2011). Die experimentelle neonatale BoDV-1-Infektion von Mäusen führt zu einem signifikanten Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 α , IL-6, IFN γ und IL-10, wohingegen anti-inflammatorische Zytokine wie IL-5 und *transforming growth factor* β 1 (TGF β 1) unverändert bleiben (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Bei TNF-transgenen Mäusen ist diese proinflammatorische Zytokinaufregulation signifikant höher als bei nicht-transgenen Mäusen (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Die BoDV-1-Infektion führt bei schon vorhandener neuronaler TNF-Überexpression jedoch zu keiner zusätzlichen TNF-Aufregulation (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Caspase-abhängige Apoptose konnte bei den Astrozyten aus BoDV-1-infizierten Mäusen nicht festgestellt werden, jedoch zeigten die Astrozyten eine gesteigerte GFAP-Expression und bei den TNF-transgenen Mäusen zusätzlich eine deutliche Hypertrophie mit vergrößerten Zellkerndurchmessern und Chromatinkondensation, welche morphologisch Zellkernen im Anfangsstadium der Apoptose ähnelten (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Die BoDV-1-Infektion von primären, kortikalen, feline Astrozyten führt zu einer nicht-zytolytischen chronischen Infektion mit damit assoziierter deutlicher Beeinträchtigung der Astrozyten Glutamat aufzunehmen, was neuronale Hyperexzitabilität zur Folge haben kann (BILLAUD *et al.*, 2000). Ursächlich wird diskutiert, dass BoDV-1 mit Glutamattransportern interferiert (BILLAUD *et al.*, 2000). Das humane T-Lymphotrope-Virus Typ 1 (HTLV-1), welches eine chronische progressive Myelopathie verursacht, hat Astrozyten als Zielzellen und verursachte in einem Modell, bei welchem Astrozyten mit chronisch HTLV-1-infizierten T-Lymphozyten in Kontakt standen, deutliche metabolische Veränderungen bei den Astrozyten (AKAOKA *et al.*, 2001). Diese zeigten eine anfängliche erhöhte und später durch TNF-Induktion vermittelte reduzierte Glutamataufnahme mit einhergehender Herunterregulation von GLT1 und GLAST (AKAOKA *et al.*, 2001). Auch das humane Cytomegalovirus führt bei Astrozyten zu Veränderungen im Glutamatstoffwechsel mit verminderter Glutamataufnahme, Glutaminsynthetase Aktivität und GLT1- und GLAST-Expression (ZHANG *et al.*, 2014). Weiterhin

spielen Astrozyten im Rahmen der Viruspersistenz als mögliche Reservoirzellen für neurotrope Stämme des humanen Immundefizienzvirus (HIV), des Tollwutvirus, des West-Nil-Virus und des *Theiler's murine encephalomyelitis virus* (TMEV) eine Rolle (DINIZ *et al.*, 2006; LUO and HE, 2015; RAY *et al.*, 1997; TORNATORE *et al.*, 1994; ZHENG *et al.*, 2001). Bei letzterem spielt für die Pathogenese die Aufregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IFN β und TNF in Astrozyten mittels NF κ B-Aktivierung eine Rolle (PALMA *et al.*, 2003). Auch für BoDV-1 werden Astrozyten und Schwann-Zellen als mögliche Reservoirzellen diskutiert, da BoDV-1-infizierte Gliazellen auch noch in der chronischen Phase der Erkrankung bei adulten Ratten nachweisbar waren, nachdem die Enzephalitis bereits abgeklungen war (CARBONE *et al.*, 1989). Das Chikungunya-Virus (Alphavirus) kann Astrozyten infizieren, was in ihnen eine Immunantwort mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen inklusive TNF auslöst, jedoch auch zur Apoptose infizierter Astrozyten durch den intrinsischen Caspase 9-Signalweg führen (siehe auch 2.2.1.) (DAS *et al.*, 2015).

2.2. ARTEN VON ZELLTOD

Neben den klassischen Zelluntergangsformen Apoptose, Nekrose und Autophagie, kennt man heutzutage noch weitere, davon abgegrenzte, regulierte Formen, wie einen Caspase-unabhängigen Zelluntergang, welcher über die Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP1) und den *apoptosis inducing factor* (AIF) vermittelt wird und Parthanatos genannt wurde, sowie die *receptor interacting protein kinase* (RIP)-abhängige regulierte Nekrose, welche daher Nekroptose genannt wird (GALLUZZI *et al.*, 2012; Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008 und VANDEN BERGHE *et al.*, 2015).

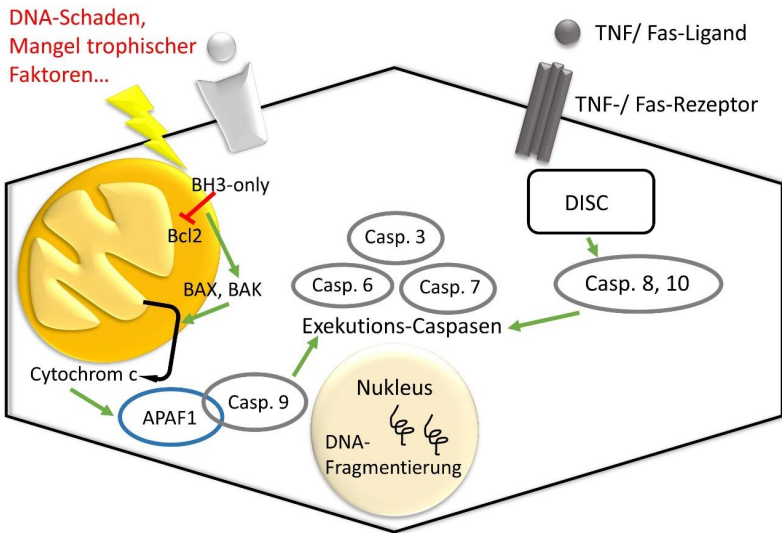
2.2.1. Apoptose

Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, der Entwicklung des Immunsystems und des Gehirns, der hormonabhängigen Involution von Geweben, der Regulierung der Zellzahl in intermitotischen Geweben (Mausergeweben) sowie bei autoimmunen und neuronalen Erkrankungen und insbesondere auch bei viralen Infektionen (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008 und KUMAR *et al.*, 2014). Sie repräsentiert den klassischen programmierten Zelltod, bei welchem die Zellbestandteile phagozytiert werden bevor es zu einem Verlust der Plasmazellintegrität kommt (SAVILL *et al.*, 1993; Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008, KUMAR *et al.*, 2014 und VANDEN BERGHE *et al.*, 2015). Es gibt einen intrinsischen und einen extrinsischen Apoptose-Signalweg (Abb. 4).

Der intrinsische Signalweg (Abb. 4A) wird durch eine Reihe unterschiedlicher intrazellulärer Schäden oder Stress-Signale wie z.B. durch DNA-Schäden, oxidativen Stress oder einen Mangel an trophischen Faktoren ausgelöst (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008 und VANDEN BERGHE *et al.*, 2015). Initial kommt es zur transkriptionellen Aufregulation des

proapoptotischen *Bcl2-homology-3(BH3)-only* Proteins, welches die anti-apoptotischen Bcl2-Familienmitglieder in der äußeren Mitochondrienmembran antagonisiert, was die Aktivierung der wiederum proapoptotischen Bcl2-Familienmitglieder BAX und BAK fördert und schließlich zur Störung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und der Abgabe von (u.a.) Cytochrom c aus den Mitochondrien führt (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008, KUMAR *et al.*, 2014 und VANDEN BERGHE *et al.*, 2015). Cytochrom c führt zur Formation des „apoptosome“-Megakomplexes von *apoptotic protease-activating factor 1* (APAF1) mit Caspase 9. Caspase 9 wird dadurch aktiviert und spaltet und aktiviert somit weitere Caspasen wie Caspase 3, 6 und 7, welche schließlich den Zelltod herbeiführen (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008, KUMAR *et al.*, 2014 und VANDEN BERGHE *et al.*, 2015). Dieser ist durch Abrundung der Zellen, vermindertes Zellvolumen, Chromatinkondensation, nukleäre Fragmentierung, Membranabschnürungen und die Bildung von Apoptosekörperchen (*apoptotic bodies*) gekennzeichnet (Übersicht bei BREDESEN, 2007, KUMAR *et al.*, 2014 und VANDEN BERGHE *et al.*, 2015).

Der extrinsische Apoptose-Signalweg (Abb. 4B) wird durch extrazelluläre Stress-Signale in Form von proapoptotischen und proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. Fas-Ligand und TNF ausgelöst, welche an Rezeptoren mit Todesdomäne der TNFR-Superfamilie (wie den TNFR1 und Fas-Rezeptor) binden (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014; VANDEN BERGHE *et al.*, 2015). Die Bindung induziert die Formation von spezifischen intrazellulären *death-inducing signaling complexes* (DISCs), welche Caspase 8 oder 10 aktivieren (MICHEAU and TSCHOPP, 2003; WANG *et al.*, 2001; Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008). Caspase 8 spaltet und aktiviert dann andere Caspasen wie Caspase 3 und 7, um den Zelltod herbeizuführen (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014). Alternativ kann Caspase 8 auch das BH3-only Protein BID spalten, was zu mitochondrialem Schaden und damit zur Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs mit einer Verstärkung des Zelltodsignals führt (BARNHART *et al.*, 2003; Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008 und KUMAR *et al.*, 2014). Dies macht Caspase 8, neben vielen weiteren Molekülen, so zu einem Verbindungsglied beider Apoptose-Signalwege. In dieser Arbeit wurde aktivierte Caspase 3, bei welcher es sich um eine sogenannte Exekutions-Caspase handelt, als Apoptosemarker verwendet, da diese sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Apoptoseweg miteinbezieht (Abb. 4).

A. Intrinsischer Apoptoseweg**B. Extrinsischer Apoptoseweg****Abb. 4: Apoptosewege**

APAF1: *apoptotic protease-activating factor 1*; BAX, BAK: Bcl2-Familienmitglieder; BH3-only: *Bcl2-homology-3-only*; Casp.: Caspase; DISC: *death-inducing signalling complex*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor

A: Intrinsischer Apoptoseweg: Durch Zellschaden kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus der inneren Mitochondrienmembran, was zur Aktivierung der Initiator-Caspase 9 mit anschließender Aktivierung der Exekutions-Caspasen (u.a. Caspase 3) führt. **B: Extrinsischer Apoptoseweg:** Über TNF- oder Fas-Rezeptor mit Todesdomäne kommt es zur Formation des DISC, welcher die Initiator-Caspasen 8 oder 10 aktiviert, was dann zur Aktivierung der Exekutions-Caspasen (u.a. Caspase 3) führt.

Manche Viren, z.B. der Familie *Herpesviridae*, sowie auch normale Zellen, produzieren den Apoptose-Inhibitor *FLICE-like inhibitory protein* (FLIP), um sich vor Apoptose zu schützen (Übersicht bei BANERJEE *et al.*, 2016, KUMAR *et al.*, 2014 und VANDEN BERGHE *et al.*, 2015). Auch das anti-apoptotische Protein Bcl2 wird von einigen Viren (γ -Herpesviren, Adenoviren, Pockenviren) während der lytischen Replikation gebildet, was die Auslösung von Apoptose durch die Inhibition von BH3-Proteinen hemmt (Übersicht bei BANERJEE *et al.*, 2016 und RAHMAN and MCFADDEN, 2006;). Das nicht-Strukturprotein 5A (NS5A) des Hepatitis-C-Virus ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, welches über verschiedene Mechanismen sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg hemmt (Übersicht bei RAHMAN and MCFADDEN, 2006). BoDV-1 ist auch in der Lage Apoptose zu inhibieren, indem das X-Protein an den Mitochondrien ansetzt und möglicherweise über eine

Hemmung der Membranpermeabilität durch Ansetzen am *permeability transition pore* (PTP)-Komplex den intrinsischen Apoptoseweg blockiert (POENISCH *et al.*, 2009). Umgekehrt kann BoDV-1 auch neuronale Apoptose durch PARP-1 und Caspase 3-Aktivierung auslösen, was einen Neuronenverlust im Hippocampus und Cerebellum zur Folge hat, wie an neonatal infizierten Ratten gezeigt wurde (HORNIG *et al.*, 1999; WILLIAMS *et al.*, 2008).

2.2.2. Caspase-unabhängiger PARP1- und AIF-vermittelter Zelltod (Parthanatos)

PARP1 ist ein nukleäres Enzym, welches durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird und für die Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren zuständig ist (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008). Eine Überaktivierung von PARP1 kann zu Caspase-unabhängigem AIF-vermitteltem Zelltod (Abb. 5) führen, wie es z.B. bei neuronalem Zelltod nach Sauerstoff-Glukose-Mangel und fokaler zerebraler Ischämie stattfindet (CREGAN *et al.*, 2002; CULMSEE *et al.*, 2005; PLESNILA *et al.*, 2004). Dieser Zelltod wurde vom *Nomenclature Committee on Cell Death* als neue Zelltodform unter dem Namen Parthanatos, welcher sich aus PAR (von Poly-ADP-Ribose) und Thanatos, der Personifikation der Mortalität/des Tods aus der griechischen Mythologie, zusammensetzt (GALLUZZI *et al.*, 2012; VIRAG *et al.*, 2013). PARP1 führt hier dazu, dass AIF, welches normalerweise als Nicotinamadenin dinukleotidhydrid (NADH)-Oxidase fungiert und sich im intermembranösen Spalt der Mitochondrienmembranen befindet, freigesetzt wird und in den Zellkern migriert, wo es dann zur DNA-Fragmentierung kommt (Abb. 5) (CULMSEE *et al.*, 2005; VIRAG *et al.*, 2013). Die PARP1-Aktivierung führt ebenfalls zur zytosolischen NAD⁺-Depletion, welche nötig ist, damit die AIF-Translokation stattfinden kann (ALANO *et al.*, 2010). Der innerhalb von Stunden stattfindenden AIF-Translokation in den Zellkern sind die zunehmende Translokation des proapoptotischen BH3-*only*-Proteins BID in die Mitochondrien, die perinukleäre Akkumulation von BID-beladenen Mitochondrien und schließlich der Verlust der mitochondrialen Membranintegrität vorgeschaltet (LANDSHAMER *et al.*, 2008). Der Nachweis von AIF im Zellkern kann also als Parthanatos-Nachweis verwendet werden, wie es auch in der hier vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Diese Form von programmiertem Zelltod ist u.a. auch bei traumatisch bedingtem neuronalem Zelltod, bei Mausmodellen für die Parkinsonsche Krankheit und bei neuronalem Zelltod nach Glutamatexzitotoxizität beschrieben und zwar spezifisch für NMDA- und Kainsäure-Exzitotoxizität, nicht jedoch für AMPA-Exzitotoxizität (CHEUNG *et al.*, 2005; SLEMMER *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2003).

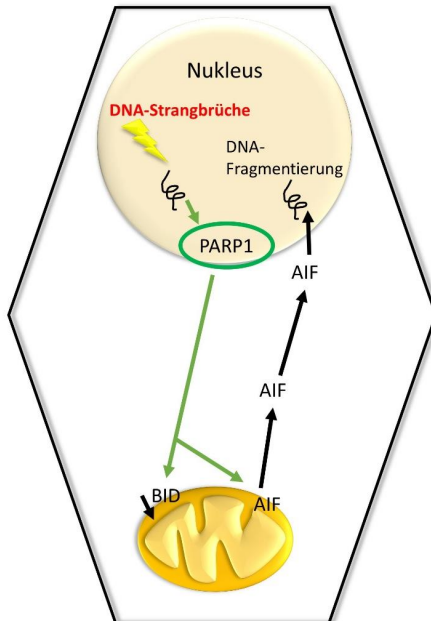


Abb. 5: Caspase-unabhängiger PARP1- und AIF-vermittelter Zelltod (Parthanatos)

AIF: *apoptosis inducing factor*; BID: *Bcl2-homology-3-only Protein*; PARP1: Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1

Durch DNA-Strangbrüche kommt es zur Aktivierung von PARP1, der Translokation von BID in die Mitochondrien und von AIF aus dem intramembranösen Spalt der Mitochondrienmembran in den Zellkern, wo es dann zur DNA-Fragmentierung und damit zum Zelltod kommt.

2.2.3. Nekrose

Nekrose (auch Nekrobiose genannt) ist der klassische unkontrollierte Zelltod infolge eines irreversiblen, letalen Zellschadens, welcher durch infektiöse Agenzien (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten), Hypoxie und extreme Umgebungskonditionen (z.B. Hitze, Kälte, Strahlung, UV-Licht) sowie durch Chemikalien ausgelöst werden kann (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014). Nekrose ist charakterisiert durch Anschwellen der Organellen und der Zelle selbst, mitochondriale Dysfunktionen, massiven oxidativen Stress und schneller Plasmamembranpermeabilisierung, was in der Regel eine inflammatorische Antwort im Gegensatz zur Apoptose zur Folge hat (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008, KUMAR *et al.*, 2014 und MCCONKEY, 1998). Von der Stärke des Schadens bzw. Dosis des Schadstoffs hängt es ab, ob es zu Apoptose oder Nekrose kommt, wobei geringere Dosen toxischer Stoffe zu Apoptose und höhere Dosen zu Nekrose führen, wie z.B. mit NMDA und Stickoxid (*nitric oxide*, NO) an kortikalen Neuronen und mit verschiedenen anderen Agenzien

an einer Tumorzelllinie gezeigt werden konnte (BONFOCO *et al.*, 1995; LENNON *et al.*, 1991). Morphologisch kann Nekrose in die sogenannte Koagulationsnekrose, bei welcher die Gewebearchitektur weitestgehend erhalten bleibt und welche häufig bei Infarkten (ausgenommen im Gehirn) gefunden wird sowie in die sogenannte Kolliquationsnekrose, bei welcher das Gewebe verflüssigt wird (v.a. im Gehirn vorkommend), unterteilt werden (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014). Zur Koagulationsnekrose zählt noch die Sonderform der verkäsenden Nekrose, welche bei der Tuberkulose vorkommt (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014).

2.2.4. Nekroptose

Der Begriff Nekroptose ist zusammengesetzt aus den Begriffen Nekrose und Apoptose und steht für Caspase-unabhängige, programmierte bzw. regulierte Nekrose. Nekroptose geht mit den gleichen morphologischen Eigenschaften wie Nekrose (siehe 2.2.3.) einher und wird, vermittelt über Zelltodrezeptoren, durch die gleichen Stimuli wie Apoptose ausgelöst (siehe 2.2.1), im Falle wenn Apoptose durch Caspase-Inhibition (u.a. Caspase 8) verhindert ist (Abb. 6) (UPTON *et al.*, 2010; Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008 und ZHOU and YUAN, 2014). Nekroptose wird durch *receptor interacting protein kinases* (RIP) ausgelöst, wobei die Aktivierung von RIP1 durch Phosphorylierung essentiell für die Auslösung von Nekroptose ist, welche wiederum durch RIP3 und der Bildung eines RIP1-RIP3-Komplexes mit *mixed lineage kinase domain-like* (MLKL) kontrolliert wird, was im weiteren Verlauf zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Abb. 6) (CHO *et al.*, 2009; Übersicht bei ZHOU and YUAN, 2014). Durch Caspase 8-vermittelte Apoptose kann Nekroptose unterdrückt werden, indem Caspase 8 die Aktivierung von RIP1 hemmt (Übersicht bei ZHOU and YUAN, 2014). Die Bildung des RIP1-RIP3-Komplexes wird z.B. durch Vaccinia-Virus-Infektionen ausgelöst, da das Virus einen Caspase-Inhibitor (B13R) bildet und insgesamt scheint Nekroptose bei Virusinfektionen und dadurch bedingter Inflammation eine wichtige Rolle zu spielen (CHO *et al.*, 2009; UPTON *et al.*, 2010; Übersicht bei KAISER *et al.*, 2013).

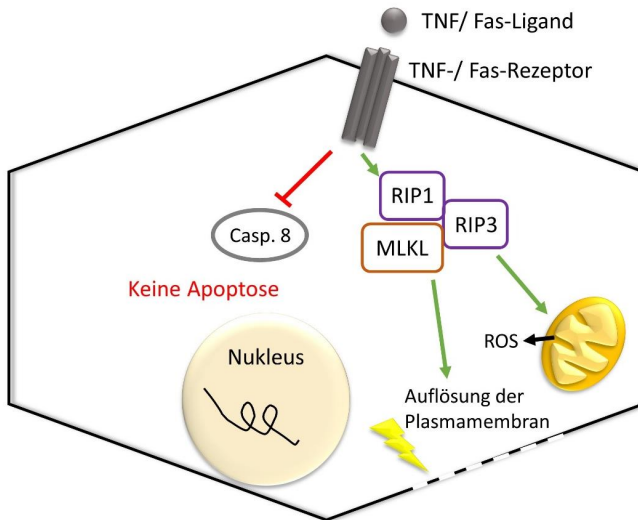


Abb. 6: Nekroptose

Casp. 8: Caspase 8; MLKL: *mixed lineage kinase domain-like*; RIP: *receptor interacting protein kinase*; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor

Nekroptose wird durch die gleichen Rezeptoren wie für Apoptose ausgelöst, wenn Caspasen (u.a. Caspase 8) inhibiert sind und daher Apoptose nicht möglich ist. Es kommt zur Phosphorylierung und dadurch zur Aktivierung von RIP1, was schließlich zur Bildung des RIP1-RIP3-Komplexes führt, welcher sich mit MLKL verbindet. Dies führt zur Produktion von ROS in den Mitochondrien und schließlich zur Auflösung der Plasmamembran.

2.2.5. Autophagie

Autophagie ist ein intrazellulärer katabolischer Mechanismus zur Degradation von zytoplasmatischen Komponenten, Proteinaggregaten und Zellorganellen, indem diese in Doppelmembran-umschlossene Vesikel, sogenannte Autophagosomen, eingeschlossen werden (Abb. 7) (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008). Diese fusionieren dann mit Lysosomen zu Autophagolysosomen, woraufhin deren Inhalt enzymatisch verdaut wird (Abb. 7) (Übersicht bei DEGTEREV and YUAN, 2008). Autophagie dient z.B. als Überlebensmechanismus der Zelle in Zeiten von Nährstoffmangel, indem die Zelle sozusagen *Recycling* ihrer eigenen Nährstoffe betreibt (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014). Der Prozess der Autophagie kann in die Schritte Initiation, Nukleation, Elongation, Maturation und Degradation eingeteilt werden (Abb. 7) (DASH *et al.*, 2016). Autophagie ist nötig für die normale Zellhomöostase, findet konstitutiv in niedrigem Maße statt und kann durch Nährstoffmangel deutlich aufreguliert werden (FLEMING *et al.*, 2011; Übersicht bei BREDESEN, 2007). Der Prozess wird durch eine große Gruppe von *autophagy-related genes* (ATGs) reguliert und kann ausgelöst werden, wenn Apoptose blockiert bzw. nicht möglich ist,

wie an embryonalen Fibroblasten aus BAX/BAK-Doppel-*knockout* Mäusen gezeigt werden konnte (SHIMIZU *et al.*, 2004; Übersicht bei BREDESEN, 2007). Eine Schnittstelle der Signalwege von Autophagie und Apoptose, welche sich somit gegenseitig beeinflussen können, findet sich z.B. in Beclin-1, dem Säugerhomolog zu ATG6, welches eine BH3-Domäne besitzt und somit mit Bcl2 interagieren kann (siehe auch Abb. 4A) (OBERSTEIN *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang spricht man bei Autophagie auch vom programmierten Zelltod Typ II im Gegensatz zu Apoptose, welche als programmierter Zelltod Typ I bezeichnet wird (BOYA *et al.*, 2005; SHIMIZU *et al.*, 2004). Das in dieser Arbeit als Autophagie-Marker verwendete *microtubule-associated protein light chain 3* (LC3) ist das Säugetier-Homolog von ATG8, welches an der Bildung der Autophagosomenmembran beteiligt ist (Abb. 7). Autophagie spielt z.B. in Neuronen bei der Alzheimerschen Krankheit eine Rolle und deren Beeinträchtigung scheint auch zur Epileptogenese durch abnormale Aktivierung von mTOR (siehe auch 2.4.1.) beizutragen (MA *et al.*, 2010; MCMAHON *et al.*, 2012). Auch Viren können Autophagie beeinflussen, z.B. ist für Hepatitis-C-Virus beschrieben, dass es Autophagie in infizierten Hepatozyten induziert um diese am Leben zu erhalten, weil es dadurch gleichzeitig den Apoptoseweg, welcher mit Zerstörung der Zelle einhergehen würde, verhindert (DASH *et al.*, 2016).

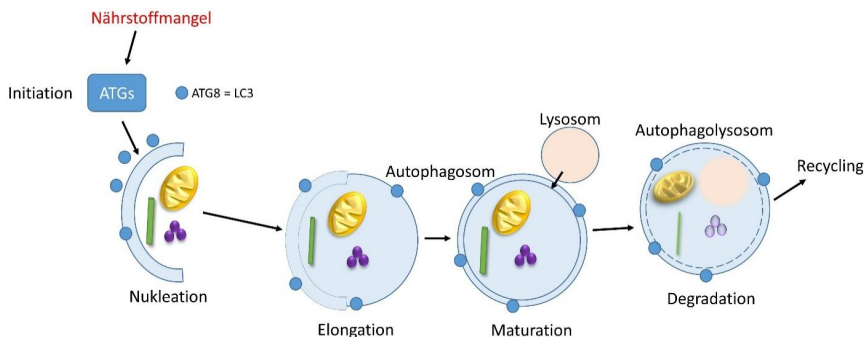


Abb.7: Autophagie (modifiziert nach Fleming *et al.*, 2011)

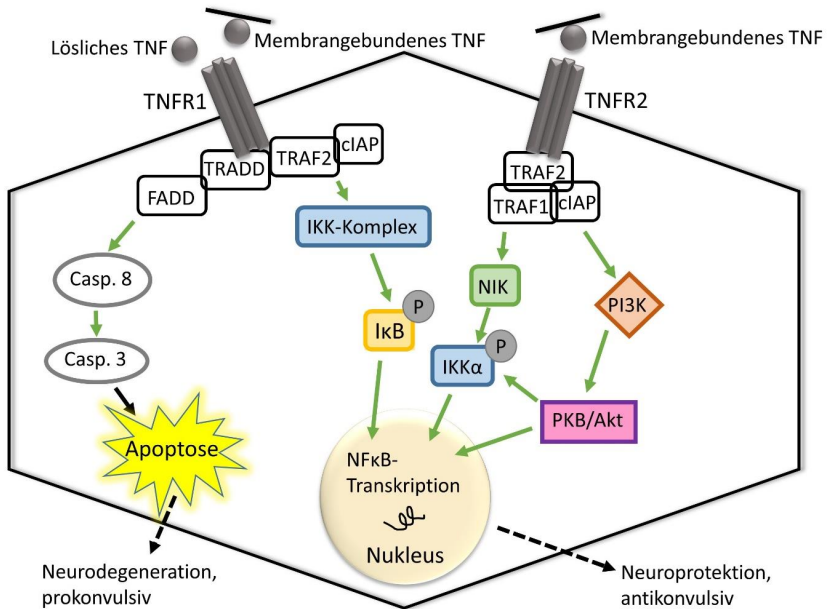
ATGs: *autophagy-related genes*; LC3: *microtubule-associated protein light chain 3*

Durch Nährstoffmangel kommt es zur Aktivierung der ATGs (Initiation), wobei das Genprodukt von ATG8 (Säugetier-Homolog = LC3) an der Bildung der Autophagosomenmembran (Nukleation) beteiligt ist. Die Membran verlängert sich und umschließt die zu verdauenden Zellorganellen/-bestandteile (Elongation). Das fertig gebildete Autophagosom reift (Maturation) und fusioniert dann mit einem Lysosom zum Autophagolysosom, wodurch es schließlich zum Abbau der zellulären Bestandteile durch die lysosomalen Enzyme kommt (Degradation). Die dadurch freigesetzten Nährstoffe können so recycled werden.

2.3. TUMOR-NEKROSE-FAKTOR UND SEINE FUNKTIONEN IM GEHIRN

TNF ist ein pleiotropes sowohl auto- als auch parakrin wirkendes Zytokin, welches im Gehirn von Gliazellen (Astrozyten, Mikroglia), Neuronen und Endothelzellen sowie von Makrophagen, Monozyten, T- und B-Zellen und natürlichen Killerzellen gebildet werden kann. TNF liegt in zwei unterschiedlichen Formen vor, es wird als 26 kDa großes, membrangebundenes Polypeptid gebildet und durch Proteolyse in eine lösliche, 17 kDa große Untereinheit gespalten (GRELL *et al.*, 1998; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Diese ist als lösliches Homotrimer biologisch aktiv und wird durch das TNF α -converting-enzyme (TACE) reguliert (SRIRAM and O'CALLAGHAN, 2007; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Unter physiologischen Bedingungen wird TNF konstitutiv hauptsächlich von Gliazellen (Astrozyten und Mikroglia) gebildet (BEATTIE *et al.*, 2002; PICKERING *et al.*, 2005). TNF ist nötig für die Erhaltung der synaptischen Übertragung an exzitatorischen Synapsen, indem es dort die Oberflächenexpression von AMPA-Rezeptoren auf Neuronen über eine Aktivierung des neuronalen TNFR1 und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) erhöht und dadurch die synaptische Effizienz steigert (BEATTIE *et al.*, 2002). Gleichzeitig sorgt TNF auch für eine Abnahme der Übertragungsstärke inhibitorischer Synapsen, indem es die Endozytose von γ -Aminobuttersäure A (GABA_A)-Rezeptoren induziert (STELLWAGEN *et al.*, 2005; STELLWAGEN and MALENKA, 2006). Gliazellen, insbesondere Astrozyten, können die Menge des umgebenden Glutamats über ihre Glutamattransporter wahrnehmen, was einen Regulationsmechanismus darstellt, wie sie die neuronale Aktivität feststellen können und dadurch ihre TNF-Produktion anpassen können (siehe auch 2.1.1.) (DIAMOND and JAHR, 2000; STELLWAGEN *et al.*, 2005; STELLWAGEN and MALENKA, 2006). So führt die Behandlung von Neuronen mit konditioniertem Medium von reinen Gliazellkulturen zu einer AMPA-Aufregulation auf den Neuronen, wohingegen die Behandlung von Neuronen mit konditioniertem Medium von Gliazellkulturen, welche zuvor mit Glutamat behandelt wurden (100 μ M für 48 Stunden), zu einer signifikant weniger effektiven AMPA-Aufregulation auf den Neuronen führt (STELLWAGEN and MALENKA, 2006). TNF kann den Astrozyten-vermittelten Glutamattransport herunterregulieren, indem es entweder direkt GLT1 herunterreguliert oder indem es Enzyme unterdrückt, welche Astrozyten benötigen um Glutamat zu prozessieren (siehe auch 2.1.1.) (CARMEN *et al.*, 2009; FINE *et al.*, 1996; HUANG and O'BANION, 1998; ZOU *et al.*, 2010; ZOU and CREWS, 2005). Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. zerebraler Ischämie, Schlaganfall, multipler Sklerose, Infektionen, Traumata, Krämpfen/Epilepsie sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. bei der Alzheimerschen und Parkinsonschen Krankheit, kommt es zu einer deutlichen Steigerung der TNF-Produktion durch die Gliazellen selbst im Rahmen einer reaktiven Gliose, aber auch durch infiltrierende Immunzellen (SRIRAM and O'CALLAGHAN, 2007). Die unterschiedlichen Funktionen von TNF werden über zwei verschiedene Oberflächenrezeptoren, TNFR1 (auch p55-Rezeptor

genannt) und TNFR2 (auch p75-Rezeptor genannt) vermittelt (Abb. 8), welche sowohl auf Neuronen als auch auf Gliazellen vorhanden sind (BOKA *et al.*, 1994). Mikroglia exprimieren sowohl TNFR1 als auch TNFR2, Astrozyten und Oligodendrozyten hingegen exprimieren überwiegend TNFR1 (CHOI *et al.*, 2005; DOPP *et al.*, 1997). Die TNFR2-Expression auf Astrozyten wird jedoch durch TNF, IL-1 und IFN γ erhöht (CHOI *et al.*, 2005). Grundsätzlich kommt der TNFR1 ubiquitär auf fast allen Zelltypen vor, wohingegen der TNFR2 unter physiologischen Bedingungen in niedrigen Mengen auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird (Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Der TNFR1 wird sowohl von löslichem als auch membrangebundenem TNF aktiviert, wohingegen der TNFR2 bei 37°C eine deutlich niedrigere Affinität für lösliches TNF hat und hauptsächlich durch membrangebundenes TNF aktiviert wird, was bedeutet, dass die Aktivierung des TNFR2 zwar länger anhält, jedoch höhere TNF-Dosen benötigt (Abb. 8.) (GRELL *et al.*, 1995; GRELL *et al.*, 1998; MARCHETTI *et al.*, 2004). Über den TNFR1 wirkt TNF primär prokunjulativ und proapoptotisch und führt zur Neurodegeneration, wohingegen es über den TNFR2 antikonjulativ, antiapoptotisch und neuroprotektiv wirkt (Abb. 8) (BALOSSO *et al.*, 2005; BALOSSO *et al.*, 2009; FONTAINE *et al.*, 2002). Prinzipiell aktivieren beide TNF-Rezeptoren unter normalen Bedingungen über den *tumor-necrosis-factor-receptor-associated-factor 2* (TRAF2) die Transkriptionsfaktoren *activator protein 1* (AP-1) und NF κ B, wobei es jedoch über den TNFR1-Signalweg (Abb. 8A) lediglich zu einer transienten Aktivierung im Rahmen der Phosphorylierung von *inhibitor of kappa B* (I κ B) und über den TNFR2-Signalweg (Abb. 8B) zu einer PI3K-abhängigen Langzeitaktivierung v.a. von NF κ B kommt (LIU *et al.*, 1996; MARCHETTI *et al.*, 2004; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011 und WAJANT and SCHEURICH, 2011). Außerdem kann es durch Aktivierung des TNFR2 auch über den nicht-kanonischen Weg mit der Aktivierung der *NF κ B-inducing kinase* (NIK) zur Langzeitaktivierung von NF κ B kommen (Abb. 8B) (RAUERT *et al.*, 2010; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B fördert u.a. die Expression von inflammatorischen Mediatoren und Apoptose-Inhibitoren wie z.B. Mitgliedern der Bcl2-Familie (siehe auch 2.2.1.) (Übersicht bei VANDEN BERGHE *et al.*, 2015). TRAFs stellen einen Überschneidungspunkt der Signalkaskaden von TNFR1 und TNFR2 dar, da TRAF2 am Anfang beider Signalwege eine Rolle spielt, worüber es zu Wechselwirkungen der beiden Signalwege kommen kann (Abb. 8) (Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). TRAF2 interagiert mit TRAF1 und der Komplex aus beiden unterdrückt die Aktivierung von Caspase 8 und wirkt so antiapoptotisch (WANG *et al.*, 1998). Nur der TNFR1 hat eine intrazelluläre Todesdomäne (*death domain*) und kann zum Einschlagen des Caspase-abhängigen Apoptosewegs führen, z.B. wenn es zur Behinderung des NF κ B-Wegs kommt (Abb. 8A) (siehe auch 2.2.1. und 2.3.1.) (FIGIEL and DZWONEK, 2007; MICHEAU and TSCHOPP, 2003; Übersicht bei VANDEN BERGHE *et al.*, 2015).

A. TNFR1-Signalweg**B. TNFR2-Signalweg****Abb. 8: TNF-Signalwege**

cIAP: cellular inhibitor of apoptosis; FADD: Fas-associated death domain; IκB: inhibitor of kappaB; IKK: IκB-Kinase; NFκB: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; NIK: NFκB-inducing kinase; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PKB: Proteininkinase B; TRADD: TNF-receptor-associated death domain; TRAF: TNF-receptor-associated factor

A: TNFR1-Signalweg: Die Bindung von löslichem oder membrangebundenem TNF an den TNFR1 führt zu einer transienten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB oder zu Apoptose. Zu Apoptose kommt es bei Aktivierung der Adapterproteine TRADD und FADD, was zur Aktivierung der Initiator-Caspase 8 mit konsekutiver Aktivierung weiterer Exekutions-Capsasen wie Caspase 3 führt. Über TRAF2 zusammen mit cIAPs kommt es hingegen zur Aktivierung des IKK-Komplexes, welcher IκB phosphoryliert, welches dann durch Ubiquitinierung abgebaut wird und so NFκB freisetzt, welches dann wiederum in den Kern wandert und zur Transkription von Apoptose-Inhibitoren wie z.B. Bcl2 führt.

B: TNFR2-Signalweg: Die Bindung von membrangebundenem TNF aktiviert den TNFR2, wodurch es über TRAF2-, cIAP- und TRAF1-Rekrutierung zur Langzeitaktivierung von NFκB kommt. Der nicht-kanonische Weg geht über NIK, welche die IκBα-Kinase aktiviert. Der kanonische Weg geht über PI3K, was wiederum über PKB/Akt-Aktivierung zur Transkription von Apoptose-Inhibitoren (z.B. Bcl2) durch NFκB führt.

TNF induziert eine astrozytäre Glutamatagabe über den TNFR1 (siehe Abb. 3) und passend dazu sind in TNFR1ko-Mäusen die extrazellulären Glutamat-Basalwerte sowie die spontane Glutamatagabe verringert im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (BALOSSO *et al.*, 2009; BEZZI *et al.*, 2001). Dieser TNF-Mechanismus ist deutlich verstärkt in Anwesenheit von aktivierten

Mikroglia, welche eine große TNF-Quelle darstellen und daher wesentlich am Umschaltvorgang von den regulatorischen zu den schädlichen TNF-Wirkungen beteiligt sind (BEZZI *et al.*, 2001; Übersicht bei SANTELLO and VOLTERRA, 2012). Hohe TNF-Dosen verstärken die Glutamatabgabe von Astrozyten (siehe Abb. 3) und können so zu Hyperexzitabilität und Glutamatneurotoxizität führen (siehe auch 2.1.1.) (BEZZI *et al.*, 2001; FIGIEL and DZWONEK, 2007; Übersicht bei SANTELLO and VOLTERRA, 2012). TNF induziert auch die Glutamatabgabe von Mikroglia, indem es deren Glutaminase aktiviert und so zur gesteigerten Umwandlung von Glutamin in Glutamat führt (Abb. 3) (TAKEUCHI *et al.*, 2006). Eine neuroinflammatorisch-bedingte TNF-Aufregulation im hippocampalen Gyrus dentatus beeinträchtigt auch Gedächtnisfunktionen im Rahmen einer Aktivierung astrozytärer TNFR1 (siehe Abb. 3) und dadurch bedingter, persistenter, funktioneller Modifizierung hippocampaler exzitatorischer Synapsen (HABBAS *et al.*, 2015).

TNF spielt eine große Rolle bei der Immunabwehr und dem Schutz vor Pathogenen wie z.B. auch vor Viren (Übersicht bei BENEDICT *et al.*, 2003). Viele Viren haben Interventionsmechanismen gegen die verschiedensten Abschnitte der TNF-Signalwege entwickelt (Übersicht bei RAHMAN and MCFADDEN, 2006). Beispielsweise inhibieren Adenoviren die TNF-Ligand-Rezeptor-Interaktion, indem sie die zur TNFR-Familie gehörenden Rezeptoren Fas, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und TNFR1 herunterregulieren und so die Apoptose der viralen Zielzellen verhindern (Übersicht bei BENEDICT *et al.*, 2003 und RAHMAN and MCFADDEN, 2006). Pockenviren antagonisieren TNF indem sie lösliche Orthologe von TNF-Rezeptoren bilden (XU *et al.*, 2000; Übersicht bei BENEDICT *et al.*, 2003 und RAHMAN and MCFADDEN, 2006). Andere Viren wie z.B. γ -Herpesviren, interferieren mit der TNF-Signalkaskade nach der Rezeptorbindung, jedoch noch vor der Aktivierung von Caspasen (siehe auch 2.2.1.) (Übersicht bei BENEDICT *et al.*, 2003). Das Nef-Protein des HIV verhindert Apoptose, indem es mit der *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), einem Molekül der TNFR1-Signalkaskade, interagiert (GELEZIUNAS *et al.*, 2001; Übersicht bei BENEDICT *et al.*, 2003). Auch der NF κ B-Weg kann durch Viren beeinflusst werden. Beispielsweise führt das Tax *transactivator* Onkoprotein des HTLV-1 zu einer persistenten Aktivierung dieses Signalwegs, was zu einer Immortalisierung der HTLV-1-infizierten T-Zellen führt (FU *et al.*, 2003; Übersicht bei RAHMAN and MCFADDEN, 2006). Das BoDV-1 hingegen besitzt eine NF κ B-inhibitorische Sequenz im Nukleoproteingegen, was den antiviralen Mechanismus der NF κ B-Aktivierung unterdrückt (siehe auch 2.5.) (MAKINO *et al.*, 2015).

2.3.1. TNF und Zelltod

TNF kann über den TNFR1 und konsekutiver Aktivierung der Adapterproteine *TNF-receptor-associated death domain* (TRADD) und *Fas-associated death domain* (FADD) letztlich über

die Aktivierung von verschiedenen Caspasen (unter anderem Caspase 8 und 3) zur Apoptose führen (siehe auch 2.2.1. und Abb. 4B sowie 2.3. und Abb. 8A). Dies kann auch über Glutamat ausgelöst werden, indem dieses die neuronale TNF-Abgabe, vermittelt über den NMDA-Rezeptor, erhöht, wie an einer neuronalen Zelllinie gezeigt werden konnte (KOGO *et al.*, 2006). Nur der TNFR1, nicht aber der TNFR2, besitzt eine Todesdomäne. Dennoch gibt es mittlerweile Hinweise dafür, dass es auch über den TNFR2 zu Zytotoxizität und Apoptose aufgrund von Überschneidungen der Signalwege kommen kann, insbesondere über TRAF (BIGDA *et al.*, 1994; DECLERCQ *et al.*, 1998; FOTIN-MLECZEK *et al.*, 2002; GRELL *et al.*, 1993; MEDVEDEV *et al.*, 1994; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Die Apoptose über den TNFR2 wird also nicht direkt, sondern indirekt ausgelöst (Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Dies erfolgt zum einen durch die Induktion von endogenem TNF, welches dann an den TNFR1 bindet, zum anderen durch eine TRAF2-abhängige Depletion der antiapoptotischen Proteine cIAP1 und cIAP2, was die Bildung des Caspase 8-aktivierenden TNFR1-Komplexes fördert und somit insgesamt die Apoptoseinduktion durch den TNFR1 selektiv verstärkt (siehe auch Abb. 8) (FOTIN-MLECZEK *et al.*, 2002; VERCAMMEN *et al.*, 1995). NF κ B hingegen blockiert die Aktivierung von Caspase 8 und unterdrückt damit Apoptose, was im Zusammenhang mit der TRAF1 und TRAF2-Interaktion steht (WANG *et al.*, 1998). Die Unterdrückung der Caspase-Aktivierung kann auch zu einem verzögerten, Caspase-unabhängigen Zelltod (Parthanatos) führen, bei welchem die mitochondriale NADH-Oxidase AIF in den Zellkern transloziert wird und dort zur Chromatinkondensation und DNA-Degradation führt (siehe auch 2.2.2. und Abb. 5) (SUSIN *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2007). Diese Form des Caspase-unabhängigen Zelltods ist unter anderem bei neuronalem Zelltod nach zerebraler Hypoxie/Ischämie und traumatisch bedingten Gehirnverletzungen sowie *in vitro* nach Sauerstoff-Glukose-Deprivation und Glutamattoxizität beschrieben (CULMSEE *et al.*, 2005; PLESNILA *et al.*, 2004; SLEMMER *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2007). Für adulte, humane Oligodendrozyten ist ein TNF-induzierter AIF-vermittelter, Caspase-unabhängiger Zelltod beschrieben (JUREWICZ *et al.*, 2005).

2.3.2. TNF und Epilepsie

TNF-transgene Mäuse, welche zunächst eine ansteigende und ab dem 14. Lebenstag eine hohe neuronale TNF-Expression im gesamten Gehirn aufweisen, entwickeln Krämpfe, Ataxien und Paresen und sterben frühzeitig an nicht-eitriger Meningoenzephalomyelitis mit fokal ausgedehnten Demyelinisierungen, vor allem in der Medulla oblongata und im zervikalen Rückenmark (PROBERT *et al.*, 1995). Histologisch zeigt sich bei diesen Mäusen eine Infiltration mit *cluster of differentiation* 4 (CD4)- und *cluster of differentiation* 8 (CD8)-positiven T-Lymphozyten, eine ausgedehnte reaktive Astrogliose und Mikrogliose sowie fokale Demyelinisierungen (PROBERT *et al.*, 1995). Mittels anti-muriner TNF-Antikörper konnten

diese Veränderungen nahezu komplett verhindert werden, was zeigt, dass eine TNF-Überexpression allein bereits zu deutlichen Veränderungen im Gehirn führen kann (PROBERT *et al.*, 1995). Bei BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäusen, welche eine moderate TNF-Überexpression zeigen, die vor allem auf Areale des Vorderhirns begrenzt ist, kommt es, im Gegensatz zu nicht-transgenen Wildtyp-Mäusen, zum Auftreten von epileptischen Krämpfen, was ebenfalls die Rolle von TNF an der Entstehung von neuronaler Hyperexzitabilität untermauert (KRAMER *et al.*, 2012). Gliazellbedingte TNF-Überexpression, z.B. durch lokalisierte Gehirnläsionen, können auch krampfartige Aktivitäten auslösen, was zur Epileptogenese führen kann (SAVIN *et al.*, 2009). Die Behandlung von murinen organotypischen hippocampalen *Slice*-Kulturen mit hohen Konzentrationen von TNF (10 ng/ml) verstärkt die Exzitotoxizität bei gleichzeitiger AMPA-Behandlung (8 μ M), wohingegen niedrige TNF-Konzentrationen (1 ng/ml) neuroprotektiv gegen AMPA-induzierten, neuronalen Zelltod wirken (BERNARDINO *et al.*, 2005). Dies ist jeweils über den TNFR1 bzw. TNFR2 vermittelt, wie an TNFR1ko- bzw. TNFR2ko-Mäusen festgestellt werden konnte (BERNARDINO *et al.*, 2005). Grundsätzlich wurde jedoch gezeigt, dass der TNFR1 bereits durch niedrige Dosen von löslichem TNF (picomol) aufgrund großer Stabilität des Ligand-Rezeptor-Komplexes aktiviert wird und dass demgegenüber die TNFR2-Aktivierung höhere Dosen von löslichem TNF benötigt, da es hier nur zu einer transienten Bindung von Ligand und Rezeptor kommt (GRELL *et al.*, 1998). Die Bindung von membrangebundenem TNF führt jedoch zu einer länger anhaltenden TNFR2-Aktivierung (MARCHETTI *et al.*, 2004). Dazu passt auch, dass die intrahippocampale Injektion von TNF (picomol) bei Wildtyp-Mäusen die Anzahl und Dauer von Kainsäure-induzierten Krämpfen inhibiert, welche bei TNFR1ko-Mäusen reduziert, jedoch bei TNFR2ko-Mäusen jeweils ohne vorausgehende TNF-Injektion verlängert waren (BALOSSO *et al.*, 2005). Dies bestätigt die antikonvulsive Rolle des TNFR2. In einem Tiermodell an Ratten, bei welchen limbische Krämpfe durch Kainsäure ausgelöst wurden, wurde festgestellt, dass es durch die Krämpfe im Hippocampus neben Neuroinflammation auch zu einer rapiden Aufregulation von TNFR1 mit gleichzeitiger Herunterregulation von TNFR2 kommt, was wiederum eine erhöhte Krampfanfälligkeit mit sich bringt (WEINBERG *et al.*, 2013).

2.4. EPILEPSIE UND NEUROINFLAMMATION

Epilepsie ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen des Menschen und die häufigste ZNS-Erkrankung beim Hund, mit einer geschätzten Prävalenz von 0,6 – 0,75 % in der gesamten Hundepopulation (BERENDT *et al.*, 2015; HESKE *et al.*, 2014; KEARSLEY-FLEET *et al.*, 2013; LICHT *et al.*, 2002; Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2011a). Das Wort Epilepsie stammt vom griechischen Verb „*epilambanein*“ ab, was so viel wie „erfasst werden/überfallen werden“ bedeutet (CHEN *et al.*, 2010). Gemäß der *International League*

Against Epilepsy (ILAE) sind Krampfanfälle transient vorkommende Anzeichen und/oder Symptome aufgrund abnormer exzessiver oder synchroner neuronaler Aktivität im Gehirn (TRINKA *et al.*, 2015). Epilepsie wird u.a. definiert als mindestens zwei unprovizierte Krampfanfälle, welche im Abstand von über 24 Stunden voneinander auftreten (BERENDT *et al.*, 2015; FISHER *et al.*, 2014). Der Status epilepticus ist definiert als ein Zustand, welcher entweder daraus resultiert, dass die Mechanismen zur Beendigung von Krampfanfällen versagen oder durch Initiation von Mechanismen, welche zu abnormen, verlängerten Krampfanfällen führen und welcher, abhängig von Typ und Dauer des Krampfanfalls, zu Langzeitkonsequenzen wie neuronalem Zelltod, neuronaler Schädigungen sowie Veränderungen von neuronalen Netzwerken führen kann (TRINKA *et al.*, 2015). Epileptische Krämpfe können in fokale und generalisierte Krämpfe unterteilt werden, wobei fokale Krämpfe nur Teile einer Gehirnhemisphäre, charakterisiert durch laterale oder regionale Symptome, und generalisierte Krämpfe beide Gehirnhemisphären gleichzeitig, charakterisiert durch bilaterale Symptome, betreffen (BERENDT *et al.*, 2015; BERG *et al.*, 2010). Die Ursachen für Epilepsie werden grob unterteilt in genetische Ursachen, strukturelle und metabolische Ursachen (unter welche auch infektiöse Ursachen fallen) sowie unklare Ursachen (BERG *et al.*, 2010). Die *International Veterinary Epilepsy Task Force* (IVETF) wurde 2014 gegründet, um auch für die Tiermedizin einen einheitlichen Konsensus zu formulieren, welcher auf der Terminologie der ILAE aufbaut, aber auch veterinärmedizinische Besonderheiten wie z.B. die Schwierigkeit der Beurteilung des Vorhandenseins von Bewusstsein während epileptischer Krämpfe berücksichtigt (VOLK, 2015). Für die Tiermedizin wird von der IVETF eine ursächliche Einteilung der Epilepsien in zwei Kategorien propagiert: 1) Idiopathische Epilepsien (unterteilt in genetische Epilepsien, vermutete genetische Epilepsien und Epilepsien unbekannter Ursache) und 2) strukturelle Epilepsien, welche durch eine bestätigte intrakraniale/zerebrale pathologische Veränderung (vaskuläre, inflammatorische/infektiöse, traumatische, anomalie-/entwicklungsbedingte, neoplastische oder degenerative Erkrankung/Ursache) hervorgerufen werden (BERENDT *et al.*, 2015). Ein Zusammenhang zwischen chronischer Gehirnentzündung einhergehend mit aktivierten Mikroglia, Astrozyten und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und epileptischen Krämpfen wurde erstmals in Patienten mit Rasmussen-Enzephalitis festgestellt (RASMUSSEN *et al.*, 1958). Hierbei spielen Antikörper gegen AMPA-Rezeptoren möglicherweise eine Rolle (NIBBER *et al.*, 2016). Mittlerweile geht man davon aus, dass Neuroinflammation sowohl Ursache als auch Konsequenz von Epilepsie sein kann und man weiß, dass das Auftreten von Fieberkrämpfen bei Kindern ein erhöhtes Risiko für weitere Krämpfe und die Entstehung von Epilepsie mit sich bringen (BERG *et al.*, 1998; Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2011a). Man unterscheidet bei der Entstehung von Krämpfen bzw. Epilepsie im Anschluss an einen Insult (wie z.B. infektiös bedingte Neuroinflammation) zwischen frühen/akuten symptomatischen Krämpfen, welche während oder innerhalb kurzer

Zeit (1-2 Wochen) nach dem Insult auftreten und späten, nicht-provozierten Krämpfen, welche erst nach Monaten oder Jahren auftreten (BEGHI *et al.*, 2010; Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2016a). Zytokine werden im gesunden Gehirn normalerweise nur in sehr niedrigen Dosen exprimiert, in Gehirngewebe mit Epilepsie sind jedoch eine deutliche Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia mit einhergehender Aufregulation von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-1 β , IL-6 und TNF, sowie Zellschädigungen und Zelluntergänge nachzuweisen (CHOI *et al.*, 2009; DE SIMONI *et al.*, 2000; RAVIZZA *et al.*, 2005). Auch im Serum und Liquor von Epilepsiepatienten kann man postiktal eine deutliche Aufregulation von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1 β , IFN γ und IL-2, aber auch von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-4 und dem sowohl mit pro- als auch mit antikonvulsiven Eigenschaften zugestandenem IL-6 beobachten (SINHA *et al.*, 2008). IL-6 und TNF sind auch im Liquor von Hunden nach epileptischen Krämpfen signifikant erhöht (MERBL *et al.*, 2014).

2.4.1. Epilepsie und Zelltod

Bezüglich der Zelluntergänge bei Epilepsie spielt vor allem die Caspase-abhängige Apoptose (siehe auch 2.2.1. und Abb. 4) eine Rolle, wie Untersuchungen am Hippocampus von Patienten mit Temporallappenepilepsie gezeigt haben (SCHINDLER *et al.*, 2006). Die nukleäre Translokation von AIF, was für den Caspase-unabhängigen PARP1-vermittelten Zelltod (siehe auch 2.2.2. und Abb. 5) sprechen würde, scheint kaum eine Rolle zu spielen (SCHINDLER *et al.*, 2006). So werden z.B. hippocampale Neurone in einem *in vitro* Epilepsiemodell vor PARP1- und AIF-vermitteltem Zelltod durch Inhibition von PARP1 geschützt (siehe auch 2.2.2. und Abb. 5) (YANG *et al.*, 2013). Bei *in vivo* Untersuchungen an Ratten mit Lithium-Pilocarpin-induziertem Status epilepticus zeigten sich keine Hinweise auf eine Aktivierung des Caspase-abhängigen programmierten Zelltods und die Neurone stellten sich morphologisch als nekrotisch dar (siehe auch 2.2.3.) (FUJIKAWA *et al.*, 2007). Die Beeinträchtigung von Autophagie (siehe auch 2.2.5. und Abb. 7) in Neuronen trägt ebenfalls zur Epileptogenese bei und zwar durch mutationsbedingte abnormale Aktivierung von mTOR, welches bei Menschen und in Tiermodellen zu hoher Epilepsieinzidenz führt und Autophagie negativ beeinflusst (MCMAHON *et al.*, 2012). Autophagie, u.a. mit dem Nachweis von erhöhten Leveln an mTOR und LC3, konnte im Hippocampus von 14 Tage alten Ratten infolge eines Status epilepticus nachgewiesen werden und ist demnach an den Zelltodmechanismen beteiligt (BENZ *et al.*, 2014). Weiterhin werden mitochondriale Dysfunktionen mit Krampf-assoziiertem neuronalem Zelltod und Epileptogenese in Verbindung gebracht (CHEN *et al.*, 2010; Übersicht bei ZSURKA and KUNZ, 2015). Glutamatransporter wie GLT1 und GLAST sind z.B. relativ empfindlich gegenüber oxidativem Schaden, sodass es hierüber zu verminderter (astrozytärer und neuronaler) Glutamataufnahme und dadurch bedingter

neuronaler Exzitotoxizität kommen kann (TROTTI *et al.*, 1998; Übersicht bei ZSURKA and KUNZ, 2015). Auch Astrozytenuntergänge, welche zur Epileptogenese beitragen können, können mitochondrial vermittelt sein z.B. durch nukleäre Translokation von AIF und dadurch bedingtem Zelltod (siehe auch 2.2.2. und Abb. 5) (GARCIA-CACERES *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009). Das Auftreten von astroglialem Zelltod ist nach Status epilepticus beschrieben und geht dem neuronalen Schaden voraus (KANG *et al.*, 2006).

2.4.2. Virale Enzephalitiden als Auslöser für Epilepsie

Eine mögliche Ursache für die Entstehung von Epilepsie sind virale Infektionen und Enzephalitiden. Das Risiko nicht-provozierte epileptische Krämpfe nach einer viralen Enzephalitis zu entwickeln ist 16fach höher als normal, wobei die meisten Krämpfe innerhalb der ersten fünf Jahre auftreten (MISRA *et al.*, 2008). Epileptische Krämpfe können nicht nur während der akuten Phase der viralen Enzephalitis entstehen, sondern auch später, nachdem die akuten Erkrankungserscheinungen der Virusinfektion bereits abgeklungen sind (MISRA *et al.*, 2008). Ein Beispiel hierfür ist die Infektion mit dem humanen Herpesvirus 6B, welches in Patienten mit mesialer Temporalappenepilepsie nachgewiesen wurde und über eine herunterregulierte GLT1-Expression in Astrozyten zu Glutamat-bedingtem neuronalem Zelltod und Entstehung von Epilepsie führt (FOTHERINGHAM *et al.*, 2007). Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit TMEV führt sowohl zu akuten spontanen Krämpfen mit Zelltod von pyramidalen Neuronen im Hippocampus einige Tage nach der Infektion, als auch zur Entwicklung von Epilepsie nach einer undefinierten Latenzperiode, was mit hippocampaler Sklerose einhergeht (SMEAL *et al.*, 2012). In der akuten Phase gehen die epileptischen Krämpfe mit stark erhöhten proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF einher (SMEAL *et al.*, 2012). Mäuse mit TNF-Defizienz zeigen weniger Krämpfe nach einer TMEV-Infektion (KIRKMAN *et al.*, 2010). Nach TMEV-Infektion haben Mäuse, welche Krämpfe hatten, stärkere entzündliche Veränderungen im Gehirn als Mäuse, die keine Krämpfe zeigten (KIRKMAN *et al.*, 2010). TNF spielt auch bei der Entstehung von epileptischen Krämpfen bei C57BL/6-Mäusen nach BoDV-1-Infektion eine entscheidende Rolle, da diese nur bei TNF-transgenen Tieren auftreten und bei homozygoten TNF-transgenen Mäusen früher und häufiger vorkommen als bei heterozygoten TNF-transgenen Mäusen (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Die Stärke sowie das zeitliche Auftreten und die Progression der Enzephalitis korreliert auch mit dem Transgenstatus, wobei homozygot TNF-transgene Mäuse die stärksten und am frühesten auftretenden entzündlichen Gehirnveränderungen nach einer BoDV-1-Infektion zeigten (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Die intrazerebrale Injektion von neurotropem Masernvirus führt bei Balb/C-Absatzmäusen zu Enzephalitis mit astro- und mikroglialer Aktivierung, Neuronendegeneration im Hippocampus und verhaltensbezogenen Krämpfen mit Todesfolge 7-8 Tage nach der Infektion (LEHRMANN *et al.*, 2008). Andere Viren, welche mit

der Entstehung von abnormen Neuronenexzitationen und epileptischen Krämpfen assoziiert wurden, sind weitere Viren aus der Familie der *Flaviviridae* (*West Nile Virus*, *Japanese encephalitis virus*, *Tick-borne encephalitis virus*, Dengue-Viren), *Paramyxoviridae* (Masernvirus) und *Orthomyxoviridae* (Influenzaviren) sowie Lentiviren (HIV) und Herpes-Simplex-Virus Typ 1, wobei viele dieser Viren einen Tropismus für den Hippocampus haben (CHENG *et al.*, 1998; KAKOTI *et al.*, 2013; KARTAL *et al.*, 2015; KELLINGHAUS *et al.*, 2008; KIJA *et al.*, 2015; TAKANASHI *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2003; Übersicht bei GETTS *et al.*, 2008, KING *et al.*, 2007 und MICHAEL and SOLOMON, 2012). In einer prospektiven Studie (über 12 Jahre) über Patienten mit in der Kindheit erworbener Herpes-Simplex-Virus Typ 1-Enzephalitis, zeigten 44 % der Patienten Krämpfe als Folgeerscheinung (ELBERS *et al.*, 2007). Durch Infektionen mit dem *Eastern Equine Encephalitis Virus* (Alphavirus) und Viren der Familie *Picornaviridae* (insbesondere Enterovirus und Parechovirus) bei Kindern entstehen vor allem akute symptomatische Krämpfe (SILVERMAN *et al.*, 2013; VERBOON-MACIOLEK *et al.*, 2008). Fokale Epilepsie ist als Langzeitfolge einer Parvovirus B19-Enzephalitis beim Mensch beschrieben (PALERMO *et al.*, 2016). Epilepsie ist auch als ein Symptom bei der kongenitalen Infektion mit lymphozytärem Choriomeningitis-Virus (LCMV) bei Kindern sowie im Tiermodell beschrieben (BONTHIUS *et al.*, 2007; HOTCHIN *et al.*, 1971; Übersicht bei BONTHIUS and PERLMAN, 2007). Ebenfalls sind Krämpfe und Epilepsie als Folge von subakuter sklerosierender Panenzephalitis (SSPE) beschrieben, bei welcher es sich um eine Enzephalitis nach einer Infektion mit möglicherweise defektem Masernvirus handelt (JOVIC, 2013).

2.5. BORNA DISEASE VIRUS

2.5.1. Borna disease virus und Bornasche Erkrankung

Das *Borna disease virus* 1 (BoDV-1) ist ein neurotropes, nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Virus von negativer Polarität, welches neuerdings unter der Spezies *Mammalian 1 bornavirus* klassifiziert ist und Mitglied der 1996 gegründeten Familie *Bornaviridae* der Ordnung Mononegavirales ist (AFONSO *et al.*, 2016; BRIESE *et al.*, 1992; KUHN *et al.*, 2014; PRINGLE, 1996). Zur Familie der *Bornaviridae* gehören daneben die sechs weiteren Spezies *Elapid 1 bornavirus*, *Passeriform 1 bornavirus*, *Passeriform 2 bornavirus*, *Psittaciform 1 bornavirus*, *Psittaciform 2 bornavirus* und *Waterbird 1 bornavirus* (AFONSO *et al.*, 2016; KUHN *et al.*, 2014). Das Virus ist benannt nach der sächsischen Stadt Borna, in welcher Ende des 19. Jahrhunderts ein seuchenhafter Ausbruch der Erkrankung unter Kavalleriepferden stattfand (ZWICK, 1939). Die 2008 in Papageienvögeln entdeckten aviären Bornaviren (ABV), welche neuerdings als *parrot bornavirus* (PaBV) 1-4 und 7 unter der Spezies *Psittaciform 1*

bornavirus geführt werden, haben im Gegensatz zu BoDV-1 einen breit angelegten Zelltropismus (AFONSO *et al.*, 2016; KUHN *et al.*, 2014; RINDER *et al.*, 2009). PaBV-Infektionen führen bei Vögeln (Psittaciden) zur neuropathischen Drüsenmagendilatation (HONKAUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008; RINDER *et al.*, 2009). Das kürzlich bei drei an Enzephalitis verstorbenen Bunthörnchenzüchtern entdeckte *variegated squirrel 1 bornavirus* (VSBV-1) ist mit dem Säugetier-BoDV-1 verwandt (Sequenzhomologie zwischen 67, 6 % und 81, 7 %) und wird in die neue Spezies *Mammalian 2 bornavirus* eingruppiert (AFONSO *et al.*, 2016; HOFFMANN *et al.*, 2015; KUHN *et al.*, 2014; SCHLOTTAU *et al.*, 2017a; SCHLOTTAU *et al.*, 2017b). VSBV-1 wurde seither bei Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*), in der Unterfamilie der Schönhörnchen (*Callosciurinae*) sowie bei einem Rotschwanzhörnchen (*Sciurus granatensis*) nachgewiesen und zeigt dort einen breit angelegten Zelltropismus (SCHLOTTAU *et al.*, 2017a).

Das BoDV-1 transkribiert und repliziert im Zellkern, was für negativ-strängige, nicht-segmentierte Einzelstrang-RNA-Viren unüblich ist (BRIESE *et al.*, 1992; CUBITT *et al.*, 1994; HONDA and TOMONAGA, 2013). Es besteht aus einem 8,9 kb großen Genom (RNA), einer Lipidhülle sowie den fünf Strukturproteinen Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Glykoprotein (G) und *large protein* (L, entspricht viraler Polymerase) sowie einem nicht-Strukturprotein, dem X-Protein (X) (Abb. 9) (BRIESE *et al.*, 1994; HERDEN *et al.*, 2013; HONDA and TOMONAGA, 2013). Anders als bei anderen negativ-strängigen RNA-Viren, hat das BoDV-1 als weitere Besonderheiten, welche als Persistenzmechanismen dienen, überlappende *open reading frames*, welche für drei Transkriptionseinheiten codieren und es kommt zum Überlesen von Transkriptionsterminationssignalen sowie zu posttranskriptionellem/alternativem RNA-Spleißen (SCHNEEMANN *et al.*, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 1994; TOMONAGA *et al.*, 2000; Übersicht bei DE LA TORRE, 2002). Die genomische RNA (gRNA) des Virus wird in Ribonukleoproteinkomplexe gepackt, die N und den viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex, welcher wiederum aus P und L besteht, enthalten (HONDA and TOMONAGA, 2013). Der virale RNA-abhängige RNA-Polymerase-Komplex ist für die Transkription und Replikation des viralen Genoms verantwortlich (HONDA and TOMONAGA, 2013). Das M ist mit der Innenfläche der Virusmembran assoziiert und für den Viruspartikelzusammenbau und das *Budding* von Bedeutung (HONDA and TOMONAGA, 2013; KRAUS *et al.*, 2001). Daneben bindet es auch an das P und ist somit auch Bestandteil des Ribonukleoproteinkomplexes, wobei es die Polymerase-Aktivität geringgradig erhöht (CHASE *et al.*, 2007). Die Spaltprodukte von G sind für das Eindringen des Virus in seine Zielzellen, die effiziente Verteilung innerhalb von Neuronen sowie für die Ausbreitung von Zelle zu Zelle nötig (BAJRAMOVIC *et al.*, 2003; HONDA and TOMONAGA, 2013; LENNARTZ *et al.*, 2016). BoDV-X inhibiert die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase sowie die Apoptose von Zellen und fördert so die nicht-zytolytische virale Persistenz und ist nötig für das Überleben

der BoDV-1-infizierten Zellen im zentralen Nervensystem (HONDA and TOMONAGA, 2013; POENISCH *et al.*, 2009; POENISCH *et al.*, 2004; SCHWARDT *et al.*, 2005). Die Transkription und Replikation von BoDV-1 wird durch das Verhältnis zwischen N, P und X reguliert (SCHWEMMLE *et al.*, 1998). Für einen aktiven Polymerase-Komplex wird ein bestimmtes N:P-Verhältnis benötigt, wobei X einen negativen regulatorischen Einfluss hat (SCHNEIDER *et al.*, 2003; SCHWARDT *et al.*, 2005).

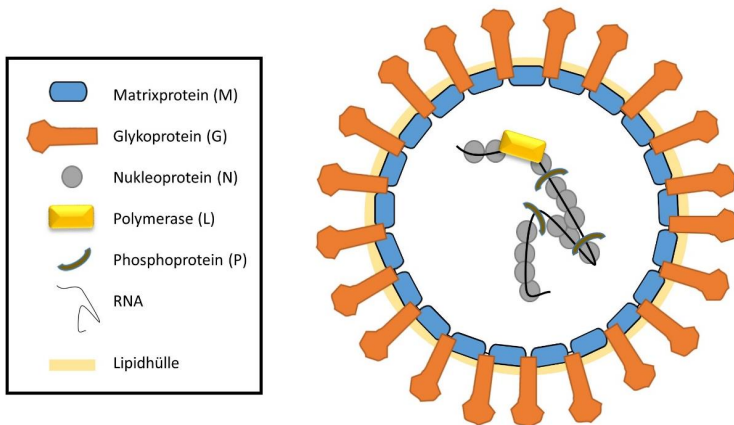


Abb. 9: Schematische Darstellung eines BoDV-1-Partikels

RNA: *ribonucleic acid*

Das *Borna disease virus 1* wird aus fünf Strukturproteinen, einer Lipidhülle und dem 8,9 kb großen Genom (negativ-strängige, nicht-segmentierte Einzelstrang-RNA) gebildet. Das Matrixprotein und Glykoprotein bilden zusammen mit der Lipidschicht die Virushülle. Im Inneren befindet sich die RNA, welche in Ribonukleoproteinkomplexe gepackt ist, welche aus den Nukleoproteinen, der RNA-Polymerase sowie den Phosphoproteinen besteht.

Das BoDV-1 ist auch in der Lage mit verschiedenen intrazellulären Signalwegen zu interagieren, wie die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade, das NFκB-System, die Proteinkinase C (PKC), das Tumorsuppressor p53-System und das antivirale Typ I Interferonsystem (SONG *et al.*, 2013; SUBERBIELLE *et al.*, 2008; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Sowohl PKC als auch die MAPK-Kaskade spielen eine Rolle bei der präsynaptischen Neurotransmitterabgabe und der synaptischen Plastizität (Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Das P wird von der ε-Isoform von PKC phosphoryliert und hemmt so kompetitiv die Phosphorylierung von endogenen zellulären PKC-Substraten (PRAT *et al.*, 2009; SCHWEMMLE *et al.*, 1997; VOLMER *et al.*, 2006; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung von P ist auch für eine effiziente virale Ausbreitung von BoDV-1 nötig (SCHMID *et al.*, 2010). In persistent infizierten Zelllinien wurde gezeigt, dass BoDV-1 zu einer

konstitutiven Aktivierung der MAPK-Kaskade, insbesondere von *extracellular signal regulated kinases* (ERKs) führt und eine spezifische Blockade dieser Kaskade die Ausbreitung des Virus in Kultur inhibiert (HANS *et al.*, 2001; PLANZ *et al.*, 2001; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Das P interferiert auch mit Amphoterin (HMGB1) und dies unterdrückt wiederum die p53-vermittelte Transkriptionsaktivität, was möglicherweise zur Viruspersistenz beiträgt (ZHANG *et al.*, 2003; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Außerdem unterdrückt P Transkriptionsfaktoren, welche bei der Interferoninduktion beteiligt sind (UNTERSTAB *et al.*, 2005; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Auch für das N ist beschrieben, dass es die Interferon Typ I-Expression inhibiert (SONG *et al.*, 2013). BoDV-1 besitzt eine NFκB-inhibitorische Sequenz im N-Gen und unterdrückt so den antiviralen Mechanismus der NFκB-Aktivierung (MAKINO *et al.*, 2015; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Umgekehrt führt eine konstitutive Aktivierung von NFκB zur Beeinträchtigung der BoDV-1-Replikation (BOURTEELE *et al.*, 2005).

Im Genom von Vertebraten (einschließlich des Menschen) als auch von Invertebraten kommen endogene Bornavirus-ähnliche Elemente (*endogenous bornavirus-like nucleoproteins*, EBLNs) vor, bei welchen es sich um Nukleotidsequenzen handelt, welche homolog zu BoDV-1-Genen sind (FUJINO *et al.*, 2014; HONDA and TOMONAGA, 2016; HORIE *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2014). Es wird angenommen, dass diese aus BoDV-1-mRNA durch reverse Transkription entstehen, wobei die reverse Transkriptase möglicherweise von Retroviren stammt (HONDA and TOMONAGA, 2016; SUZUKI *et al.*, 2014). Die Integration der endogenen Bornavirus-ähnlichen Elemente kann dabei aus stammesgeschichtlich lange zurückliegenden als auch aus kürzlich erfolgten BoDV-1-Infektionen stammen (DÜRRWALD *et al.*, 2014; FUJINO *et al.*, 2014; HORIE *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2014). EBLNs können als dominant negative Formen von viralen Proteinen, als proRNAs oder als DNA- oder RNA-Elemente, welche die Genexpression modellieren, fungieren und daher möglicherweise eine Rolle bei der antiviralen Immunität spielen (HONDA and TOMONAGA, 2016).

Das klassische BoDV-1 ist im End- bzw. Fehlwirt streng neurotrop und führt nach einer Inkubationszeit von zwei Wochen bis zu mehreren Monaten bei seinen natürlichen Endwirten Pferd und Schaf zu einer progressiven, nicht-eitrigen, T-Zell-vermittelten Meningoenzephalomyelitis mit persistierender Infektion des ZNS, welche beim Pferd in 90 % der Fälle tödlich verläuft (HERDEN *et al.*, 2013; KATZ *et al.*, 1998; SCHMIDT, 1952; VAHLENKAMP *et al.*, 2002; Übersicht bei LUDWIG *et al.*, 1988 und ROTT and BECHT, 1995). BoDV-1 geht eine stabile Interaktion mit den Histonen der Wirtszellen ein, was auch zur viralen Persistenz im Kern von Neuronen beiträgt (BONNAUD *et al.*, 2015; MATSUMOTO *et al.*, 2012). Dabei inhibiert P die Aktivität der zellulären Histon-Acetyltransferase und moduliert so die Virusreplikation (BONNAUD *et al.*, 2015). Zur Persistenz von BoDV-1 tragen weiterhin der Neurotropismus, die intraaxonale Virusausbreitung sowie die relativ hohe Konservierung des

Genoms und die bereits zuvor beschriebenen Besonderheiten bei der Replikation und Transkription des Virus bei (BINZ *et al.*, 1994; GOSZTONYI and LUDWIG, 1995; HERDEN, 2009).

BoDV-1 ist endemisch in bestimmten Gebieten in Deutschland, Österreich, Lichtenstein und der Schweiz (Übersicht bei ROTT and BECHT, 1995 und STAEHEL *et al.*, 2000). Sowohl in Deutschland als auch in der Schweiz und in Österreich konnte die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) als Reservoirwirt bestätigt werden (BOURG *et al.*, 2013; DÜRRWALD *et al.*, 2014; HILBE *et al.*, 2006; WEISSENBOCK *et al.*, 2017; Übersicht bei ROTT and BECHT, 1995). Die natürliche BoDV-1-Infektion von Endwirten erfolgt sehr wahrscheinlich über Nervenendigungen im olfaktorischen Epithel, von wo aus das Virus dann intraaxonal über den Nervus olfactorius ins Gehirn gelangt (HERDEN *et al.*, 2013; KUPKE *et al.*, 2016; MORALES *et al.*, 1988). Experimentelle Studien haben gezeigt, dass nach intranasaler BoDV-1-Infektion von Ratten Virusantigen (BoDV-N) sowie für BoDV-N kodierende messenger RNA (mRNA) bereits 4 Tage, infektiöses Virus 6 Tage und genomische RNA (gRNA) aus dem Bereich des N-Gens 7 Tage nach der Infektion (*days post infection*, dpi) im olfaktorischen Epithel nachzuweisen waren (KUPKE, 2016; MORALES *et al.*, 1988). Virusantigen (BoDV-N) konnte in reifen und unreifen olfaktorischen Neuronen, in proliferierenden und horizontalen Basalzellen, in Stützzellen, in olfaktorischen Hüllzellen und in Nervenfasern des olfaktorischen Epithels nachgewiesen werden (KUPKE, 2016). Im Gehirn der Ratten konnte 8-14 dpi Virusantigen nachgewiesen werden und die ersten entzündlichen Veränderungen des Gehirns traten frühestens 18 dpi auf (KUPKE, 2016; MORALES *et al.*, 1988). Über Rezeptor-vermittelte Endozytose infiziert BoDV-1 im zentralen Nervensystem primär Neurone, aber auch Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen (CARBONE *et al.*, 1991; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; HERDEN *et al.*, 2013). Die Ausbreitung von BoDV-1 im Gehirn erfolgt über Zell-zu-Zell-Kontakte und wird durch G vermittelt, wie in Zellkulturuntersuchungen festgestellt werden konnte (LENNARTZ *et al.*, 2016). Die Expression von G wird *in vivo* durch das Virus über begrenzten nukleären Export und begrenzte Translation reguliert, um sich dem Immunsystem zu entziehen (WERNER-KEIŠS *et al.*, 2008).

Neben den natürlichen Endwirten Pferd und Schaf, bei welchen es klinisch zu neurologischen Symptomen wie z.B. Ataxie, Depression, Kreisbewegungen, Stehen in unphysiologischen Positionen, Niederstürzen, in Gegenstände Hineinrennen und Paralysen kommt, können auch viele andere Tierarten mit BoDV-1 (experimentell) infiziert werden (GRABNER and FISCHER, 1991; GRABNER *et al.*, 2002; HERDEN *et al.*, 2013; Übersicht bei RICHT *et al.*, 1997 und ROTT and BECHT, 1995). Ähnlich der BoDV-1-Infektion beim Pferd oder Schaf, führt das neu entdeckte VSBV-1 beim Mensch zu Enzephalitis und neurologischen Symptomen mit Fieber, Zittern und myoklonischen Krämpfen (HOFFMANN *et al.*, 2015). Bei Lewis-Ratten führt die BoDV-1-Infektion von adulten Tieren zu einer CD4-T-Zell-vermittelten, nicht-eitrigen

Meningoenzephalitis mit klinischen Symptomen ähnlich wie beim Endwirt (RICHT *et al.*, 1994). Im Gegensatz führt die intrazerebrale BoDV-1-Infektion adulter Mäuse sowie von Ratten des *black-hooded* Inzuchtstamms, welche eine genetische Resistenz zu haben scheinen, zu keinen Symptomen (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HERZOG *et al.*, 1991; RICHT *et al.*, 1994). Dagegen führt die intrazerebrale BoDV-1-Infektion von neonatalen Mäusen häufig zum Auftreten neurologischer Symptome (MRL-Mäuse besonders empfänglich, Balb/c und C57BL/6 Mäuse weniger empfänglich), wie z.B. unphysiologischer Positionierung der Hinterbeine, gekrümmter Rückenhaltung, gebeugter Kopfhaltung und progressiver Paraparese (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). Dies geht einher mit einer entsprechenden nicht-eitrigen Meningoenzephalitis, welche einen zytotoxischen CD8-T-Zell-vermittelten, immunpathologischen Prozess, welcher von CD4-T-Helferzellen abhängig ist, darstellt (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HAUSMANN *et al.*, 1999; HAUSMANN *et al.*, 2001; RICHTER *et al.*, 2007). Das Auftreten und die Schwere der Erkrankung sind stark vom Mausstamm abhängig. Insbesondere der H-2^k Haplotyp hat bei Mäusen eine hohe Empfänglichkeit, was eine gegen das im N-Protein lokalisierte TELEISSI-Epitop gerichtete Immunantwort zur Folge hat (HAUSMANN *et al.*, 1999; RICHTER *et al.*, 2007). Dagegen zeigen C57BL/6-Mäuse nur selten und meist transiente Krankheitsanzeichen (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HAUSMANN *et al.*, 1999). Die unterschiedliche Reaktion von Mäusen auf eine intrazerebrale BoDV-1-Infektion im Gegensatz zu Lewis-Ratten wird dadurch erklärt, dass das Virus in Mäusen initial streng neurotrop ist und bis zur Ausbildung der vollständigen Immunkompetenz nicht in peripheren Organen zu finden ist (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HAUSMANN *et al.*, 1999). Das führt dazu, dass es beim späteren Antigenkontakt in der Peripherie zu einer T-Zell-Antwort und nicht, wie bei neonatal infizierten Lewis-Ratten, bei welchen Virus-RNA schon früh im Thymus nachzuweisen ist, zu einer Immuntoleranz kommt (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HAUSMANN *et al.*, 1999). Durch diese Immuntoleranz kommt es bei neonatal BoDV-1-infizierten Ratten zu einer lebenslangen Viruspersistenz mit Ausscheidung von infektiösem Virus im Urin, jedoch ohne Krankheitserscheinungen, was dem Bild des Reservoirwirts gleicht (BOURG *et al.*, 2013; HIRANO *et al.*, 1983; NOBACH *et al.*, 2015; SAUDER and STAEHEL, 2003). Die durch die BoDV-1-Infektion vermittelte Typ 1 T-Zell-Antwort ist durch IFN γ und TNF-Produktion charakterisiert und führt zur T-Zell-vermittelten Meningoenzephalitis (HATALSKI *et al.*, 1998; Übersicht bei TIZARD *et al.*, 2016). Das N ist der Hauptangriffspunkt antiviraler CD8-T-Zellen in Mäusen (RICHTER *et al.*, 2007). Die neonatale intrazerebrale BoDV-1-Infektion von C57BL/6-Mäusen mit neuronaler Überexpression von TNF führt zu einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis mit Auftreten von epileptischen Krämpfen (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Diese treten bei homozygot TNF-transgenen Tieren im Vergleich zu heterozygoten Tieren häufiger auf und gehen mit stärkerer Ausprägung und Progression der Meningoenzephalitis sowie mit aktivierten hypertrophen Astrozyten und schlechterer

Gewichtsentwicklung einher (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Auch die BoDV-1-Infektion neugeborener IL-12-transgener Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund führt zu neurologischen Symptomen und Infiltration von CD4- und CD8-T-Zellen im Gehirn sowie ausgeprägter Astroglie in den Gehirnregionen mit stärkster Transgenexpression im Vergleich zu BoDV-1-infizierten Wildtypmäusen, welche keine oder deutlich später und milder auftretende klinische Symptomen haben (FREUDE *et al.*, 2002). In IL-12-transgenen Mäusen ist der Krankheitsverlauf nach neonataler BoDV-1-Infektion beschleunigt und in Mäusen mit H-2^k-Hintergrund kommt es zu ausgeprägten lymphozytären Infiltraten im Kleinhirn (HOFER *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den beiden Zytokinen TNF und IL-12, scheint IFN γ eine wichtige Rolle bei der Resistenz des Wirts gegenüber einer Infektion des zentralen Nervensystems mit BoDV-1 und der Beseitigung von BoDV-1 aus Neuronen zu spielen (HAUSMANN *et al.*, 2005; HOFER *et al.*, 2004). Sowohl in neonatal als auch adult BoDV-1-infizierten Ratten kommt es zur Dysregulation neuroaktiv wirkender Metaboliten des Kynurenin-Signalwegs, was neben immunvermittelten Prozessen zu neurodegenerativen Veränderungen führen kann (FORMISANO *et al.*, 2017). In TNF-transgenen, neuronalen Kulturen kommt es nach einer BoDV-1-Infektion zu einer Dysregulation des Dynorphin-Systems und NF κ B-Signalwegs (BRACHTHÄUSER *et al.*, 2013). Die BoDV-1-Infektion führt auch über die Aktivierung von Mikroglia und dadurch bedingter Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie TNF, IFN β , IL-10 sowie von reaktiven Sauerstoffspezies zu neuronalen Dysfunktionen und Zelltod/Apoptose (siehe auch 2.2.1. und 2.3.1.) (OVANESOV *et al.*, 2008b; OVANESOV *et al.*, 2006; WEISSENBOCK *et al.*, 2000; Übersicht bei TIZARD *et al.*, 2016). Die Aktivierung von Mikroglia erfordert jedoch die Anwesenheit von Astrozyten, welche wiederum durch BoDV-1-infizierte Neurone aktiviert werden, da weder BoDV-1 selbst, noch BoDV-1-infizierte Neurone allein zur Mikrogliaaktivierung führen, wie in Mischkulturen gezeigt werden konnte (OVANESOV *et al.*, 2008a). Insgesamt lassen sich verschiedenste Zellen in Kultur mit BoDV-1 infizieren, darunter auch primäre Astrozyten (AHLEMEYER *et al.*, 2013; HERZOG and ROTT, 1980; MELO *et al.*, 2013; RICHT and STITZ, 1992). BoDV-1 verursacht in Zellkulturen eine persistente, nicht zytotoxische/zytolytische Infektion (HERZOG and ROTT, 1980). Es ist zellassoziiert und zellfreies Virus spielt nur eine untergeordnete Rolle während der BoDV-1-Infektion und -Ausbreitung (HERZOG and ROTT, 1980; LENNARTZ *et al.*, 2016). Reife Viruspartikel kommen bei manchen Zelllinien, z.B. bei persistent BoDV-1-infizierten *Madin Darby canine kidney* (MDCK)-Zellen oder BoDV-1-infizierten humanen Neuroblastomzellen vor (COMPANS *et al.*, 1994; LENNARTZ *et al.*, 2016; PYPER and CLEMENTS, 1994).

2.5.2. Borna Disease Virus und Epilepsie

Die neonatale intrazerebrale BoDV-1-Infektion von TNF-transgenen Mäusen führt zu spontan auftretenden, epileptischen Krämpfen, sowohl in Form von komplexen partiellen/fokalen

Krämpfen als auch von generalisierten Krämpfen (siehe auch 2.4.), wovon letztere immer tödlich enden (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). In einem weiteren Tiermodell für virale Enzephalitis, bei welchem adulte Lewis-Ratten intrazerebral mit BoDV-1 infiziert wurden, entwickelten diese myoklonische, generalisiert klonische oder atonische epileptiforme Krämpfe durch Naloxonbehandlung (SOLBRIG *et al.*, 1996). BoDV-1 blockiert selektiv die Aktivitäts-bedingte Verstärkung von neuronalen Netzwerken und kann dadurch die synaptische Plastizität beeinträchtigen (VOLMER *et al.*, 2007). Beim Menschen wurde längere Zeit eine Rolle der BoDV-1-Infektion bei psychiatrischen Erkrankungen kontrovers diskutiert, jedoch konnten diverse Studien keinen eindeutigen Zusammenhang feststellen, sodass Laborkontaminationen für die positiven Beschreibungen nicht auszuschließen sind (CZYGAN *et al.*, 1999; DÜRRWALD *et al.*, 2007; HORNIG *et al.*, 2012). Eine Studie konnte jedoch zeigen, dass das BoDV-P die Neurogenese von humanen GABA-haltigen Neuronen hemmt, was einen Prozess darstellt, welcher bei verschiedenen neuropsychiatrischen Störungen beeinträchtigt ist (SCORDEL *et al.*, 2015). In Gehirnen von Menschen, welche an Epilepsie leiden, konnte bislang kein BoDV-1 als Auslöser nachgewiesen werden (HOFER *et al.*, 2006). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die BoDV-1-Infektion von hippocampalen Rattenneuronen das gesteigerte *Recycling* von synaptischen Vesikeln im Anschluss an Stimuli durch Inhibition von PKC-Signalwegen vermittelt über das P hemmt (siehe auch 2.5.) (PRAT *et al.*, 2009; VOLMER *et al.*, 2006). Dadurch wird die präsynaptische Aktivität beeinträchtigt (PRAT *et al.*, 2009; VOLMER *et al.*, 2006). Bei Ratten ist, abhängig vom genetischen Hintergrund, eine neonatale BoDV-1-Infektion auch mit einem progressivem Verlust von Granularzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus, von Purkinje- und Körnerzellen im Kleinhirn und von GABA-haltigen Neuronen im Neocortex assoziiert (BAUTISTA *et al.*, 1995; EISENMAN *et al.*, 1999; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000; HORNIG *et al.*, 1999; MAYER *et al.*, 2005; PLETNIKOV *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2013). Der Neuronenverlust in Hippocampus und Kleinhirn wird hauptsächlich auf Apoptose (siehe auch 2.2.1.) zurückgeführt (HORNIG *et al.*, 1999; WEISSENBOCK *et al.*, 2000). Aus Mikrodialysestudien mit Ratten ist bekannt, dass BoDV-1 die extrazellulären Basallevel von Glutamat anhebt, ohne die Proteinlevel von Glutamattransportern zu verändern, was auf eine verminderte Glutamatrückaufnahme zurückzuführen sein könnte und zu Glutamatexzitotoxizität führen kann (siehe auch 2.1.1. und Abb. 2, 3) (OVANESOV *et al.*, 2007). An primären, feline, kortikalen Astrozyten konnte passend dazu festgestellt werden, dass deren Fähigkeit Glutamat aufzunehmen durch eine chronische BoDV-1-Infektion beeinträchtigt wird (BILLAUD *et al.*, 2000). Vermehrtes Glutamat im synaptischen Spalt kann zu Exzitoneurotoxizität und so zur Entstehung von epileptischen Krämpfen bzw. Epilepsie beitragen (siehe auch 2.1.1. und 2.4.)

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. *IN VIVO* UNTERSUCHUNGEN

3.1.1. Mäuse

Es wurden vier verschiedene Mausstämme mit jeweils einem C57BL/6J-Hintergrund und ohne Rücksicht auf Geschlechterverteilung verwendet (siehe 3.1.1.1. und 3.1.1.2.). Die Aufrechterhaltung der Zucht erfolgte im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die im Tierversuch verwendeten Tiere wurden in der Tierversuchsanlage des Biosicherheitslabors 3 (BSL3) bzw. BSL2 der Philipps-Universität Marburg gezüchtet und gehalten. Die Tierversuche dieser Arbeit wurden gemäß den tierschutzrechtlichen Bestimmungen für genehmigungspflichtige Tierversuche durchgeführt (Regierungspräsidium Gießen, Aktenzeichen V54-19c 2015(1) GI18/4 Nr. 12/2012).

3.1.1.1. TNF-transgene (TNF-tg) Mäuse und nicht-transgene Wildtyp (wt)-Mäuse

Die wt-Mäuse (C57BL/6JOlaHsd) wurden von Harlan *Laboratories* GmbH bezogen.

Die TNF-tg Mäuse (C57Bl/6-Tg(Grn2b-Tnf)^{41.3MK}) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Ulrich L. M. Eisel, *Department of Molecular Neurobiology* der Universität Groningen, Niederlande zur Verfügung gestellt. Bei diesen Mäusen wird das murine TNF unter der Kontrolle des Promotors der NR2B-Untereinheit des NMDA-Glutamatrezeptorgens (bei der Maus auch als $\epsilon 2$ -Untereinheit bezeichnet) exprimiert (Abb. 10), was zu einer selektiven TNF-Überexpression hauptsächlich im Ammonshorn, Cortex cerebri, Thalamus und Striatum führt (MARCHETTI *et al.*, 2004). Dies entspricht dem Verteilungsmuster des Promotors (WATANABE *et al.*, 1993). In den *in vivo* Versuchen wurden zum Teil homozygote (tg/tg) und heterozygote (tg/+) TNF-transgene Mäuse verwendet, um den Effekt unterschiedlich hoher TNF-Spiegel im Gehirn untersuchen zu können.

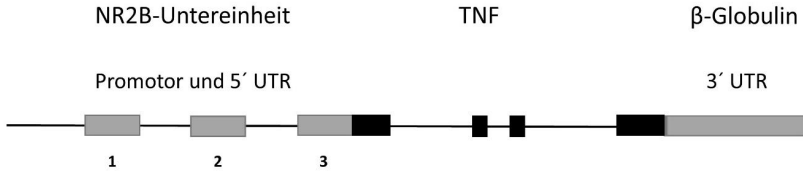


Abb. 10: Schematische Darstellung des TNF-Transgenkonstrukts in der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors in Anlehnung an Marchetti *et al.*, 2004

Graue Kästen 1, 2, 3: Exone der Promotorregion; UTR: *untranslated region*; schwarze Kästen: Exone des eingefügten murinen TNF-cDNA-Fragments

Der Promotor und die 5' UTR der NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors sind mit der Narb-Stelle des murinen TNF-Gens in Exon 1 verbunden. Die 3' UTR des murinen TNF-Gens ist durch das humane β -Globulin-Gen ersetzt.

3.1.1.2. TNF-Rezeptor-1-*knockout* (TNFR1ko)- und TNF-Rezeptor-2-*knockout* (TNFR2ko)-Mäuse

Die TNFR1ko-Mäuse (B6.129-Tnfrsf1a^{tm1Bl/J}) und TNFR2ko-Mäuse (B6.129S2-Tnfrsf1b^{tm1Mwm/J}) wurden freundlicherweise ebenfalls von Prof. Dr. Ulrich L. M. Eisel, *Department of Molecular Neurobiology* der Universität Groningen, Niederlande zur Verfügung gestellt.

Bei den TNFR1ko-Mäusen sind die Exone 2, 3 und ein Teil von Exon 4 des TNFR1-Gens durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ausgetauscht (Abb. 11) (ROTHER *et al.*, 1993). Homozygote TNFR1ko-Mäuse sind resistenter gegenüber Lipopolysacchariden, haben aber eine erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen mit *Listeria monocytogenes* (ROTHER *et al.*, 1993). Außerdem zeigen TNFR1ko-Mäuse im Alter Gedächtnisbeeinträchtigungen bezüglich räumlicher Wiedererkennung (NAUDE *et al.*, 2014).

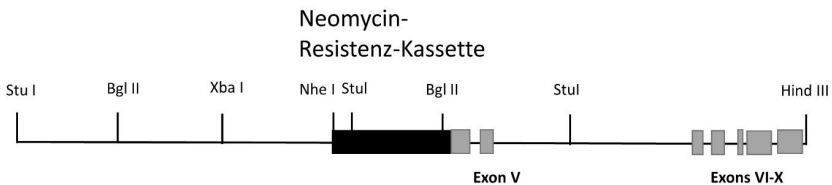


Abb. 11: Schematische Darstellung der eingefügten Neomycin-Resistenz-Kassette in das TNFR1-Gen in Anlehnung an Rothe *et al.*, 1993

Die Exone II, III und ein Teil von Exon IV des TNFR1-Gens sind durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt, was die Einführung neuer StuI- und Bgl II-Restriktionsschnittstellen bedingt hat.

Bei den TNFR2ko-Mäusen ist eine Neomycin-Resistenz-Kassette in das 2. Exon, welches die Signalpeptid-Region des TNFR2 enthält, inseriert (Abb. 12) (ERICKSON *et al.*, 1994).

Homozygote TNFR2ko-Mäuse zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber TNF-induziertem Zelltod und sind resistent gegenüber zerebraler Veränderungen durch experimentelle Malaria-Infektion (ERICKSON *et al.*, 1994; LUCAS *et al.*, 1997). TNFR2ko-Mäuse zeigen Beeinträchtigungen bezüglich der Erfassung neuer Objekte, dem räumlichen Gedächtnis, kontextbezogener Angstkonditionierung und motorischen Leistungen (NAUDE *et al.*, 2014). Bei jung-adulten Tieren kann es zu erhöhter Ängstlichkeit im Vergleich zu gleichalten wt-Mäusen kommen (NAUDE *et al.*, 2014).

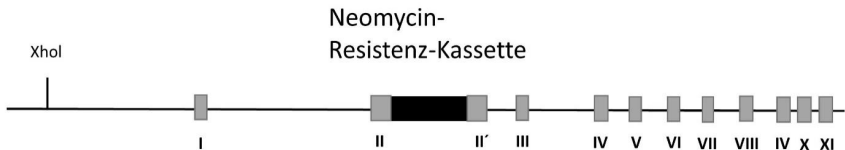


Abb. 12: Schematische Darstellung der eingefügten Neomycin-Resistenz-Kassette in das TNFR2-Gen in Anlehnung an Erickson *et al.*, 1994

Eine Neomycin-Resistenz-Kassette ist in das Exon II des TNFR2-Gens inseriert.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich homozygote TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse verwendet.

3.1.1.3. Analyse des transgenen Status der TNF-transgenen Mäuse mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Zur Genotypisierung der TNF-tg-Mäuse wurde DNA aus Mäuseschwänzen mittels des *Puregene® Core Kit A* (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Die qPCR erfolgt nach dem Prinzip der *Comparative Quantification* mittels der Rotor-Gene Q® Series Software (Qiagen GmbH, Hilden) unter Verwendung des Rotor-Gene® SYBR® Green PCR-Kits (Qiagen GmbH, Hilden). Hierbei wird die Differenz aus dem Schwellenwert (*threshold cycle*, ct) eines interessierenden Gens (*gene of interest*, GOI) und dem ct eines Normalisierungsgens (*Normalizer*) gebildet (Δ ct). In diesem Fall ist das TNF-Gen das GOI und das *Housekeeping*-Gen für Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) der *Normalizer*. Die entsprechenden Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet. DNA eines im Herkunftsbestand homozygot (TNF-tg/tg) getesteten Tiers diente als Kalibrator. Für jede zu messende unbekannte Probe wurde die Differenz des berechneten Δ cts mit dem Δ ct des Kalibrators gebildet ($\Delta\Delta$ ct). Dabei ist essentiell, dass die Amplifikationseffizienz des GOI und des *Normalizers* identisch sind. Unter der weiteren Voraussetzung, dass die Effizienz der PCR nahe bei 2 liegt (Verdopplung der Amplifikate bei jedem Lauf), kann die relative Quantität mittels folgender Formel berechnet werden:

$$ct_{GOI} - ct_{Normalizer} = \Delta ct$$

$$\Delta ct_{unbekannte\ Probe} - \Delta ct_{Kalibrator} = \Delta \Delta ct$$

$$Relative\ Quantität = 2^{-\Delta \Delta ct}$$

Alle Proben wurden in einem Doppelansatz gemessen. Neben dem homozygoten Kalibrator wurden jeweils auch immer ein sicher heterozygot TNF-transgen und nicht-transgen (Wildtyp) getestetes Tier als Kontrolle mitgeführt. Außerdem wurde bei jedem Lauf eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher steriles Wasser anstelle von DNA eingesetzt wurde. Der Reaktionsansatz für die qPCR findet sich in Tabelle 2, die Reaktionsbedingungen sind darunter aufgelistet.

Für die Auswertung des Transgenstatus der Mäuse wurde folgende Einteilung verwendet (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007):

<u>Relative Quantität:</u>	<u>Transgenstatus:</u>
0,0	Wildtyp
0,3 – 0,7	Heterozygot
≥ 0,8	Homozygot

Tabelle 1: Verwendete Primer für die qPCR

Primer	Sequenz (5' → 3')	Amplikonlänge
<i>Sense</i> NMDAtg42	CTG GAT ATT CCC AAC ATG CG	251 bp
<i>Antisense</i> mTNFseq3	CCC CGA ACG TCA GTA GAC AG	
<i>Sense</i> murines GAPDH	GAG GCC GGT GCT GAG TAT GT	288 bp
<i>Antisense</i> murines GAPDH	GGT GGC AGT GAT GGC ATG GA	

NMDAtg42 und mTNFseq3: Primerpaar zum Nachweis des transgenen murinen TNF; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; GAPDH: Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; bp: Basenpaare

Tabelle 2: Herstellung des Reaktionsansatzes für die qPCR

Reagenz	Konz. Stammlsg.	Volumen	Konz. 25 µl qPCR Ansatz
qPCR Mastermix			
SYBR® Green MM Puffer	2 x	12,50 µl	1 x
<i>Sense</i> Primer	100 µM	0,25 µl	1000 nM
<i>Antisense</i> Primer	100 µM	0,25 µl	1000 nM
Wasser		11,00 µl	
25 µl qPCR Ansatz			
Mastermix		24,00 µl	1 x
DNA		1,00 µl	80 ng/µl
Gesamt		25,00 µl	

Konz. Stammlsg.: Konzentration der Stammlösung; Konz. 25 µl qPCR Ansatz: Konzentration in 25 µl qPCR Ansatz; MM: Mastermix; SYBR® Green MM Puffer: aus Rotor-Gene® SYBR® Green PCR-Kit 20

Die qPCR wurde als *Two-step* Methode mit Schmelzkurve bei folgenden Programmeinstellungen mittels der Rotor-Gene Q® Series Software (Qiagen GmbH, Hilden) auf dem Thermocycler Rotor-Gene Q® (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95°C	5 Min.
40 Zyklen à (1 – 2):		
1. Denaturierung:	95°C	5 Sek.
2. Primeranlagerung und Elongation:	60°C	10 Sek.

Die Schmelzkurve wurde von 72°C – 95°C durchgeführt und bei jedem Schritt um 1°C erhöht. Unter der Voraussetzung, dass jedes PCR-Produkt eine spezifische Schmelzkurve hat, kann so die Identität des Amplifikats überprüft werden.

3.1.1.4. Analyse des transgenen Status der TNF-Rezeptor-*knockout*-Mäuse mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung der TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse wurde DNA aus Mäuseschwänzen mittels des *Puregene® Core Kit A* (Qiagen GmbH, Hilden) gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Die Proben wurden im Falle der Untersuchung zum Nachweis des TNFR1-Gens in zwei separate PCRs eingesetzt, wobei eine PCR das TNFR1-Gen des Wildtyps nachwies (Primerpaar TNFR1-2883 und TNFR1-4938, siehe Tabelle 3) und die andere PCR die Neomycin-Resistenz-Kassette (Primerpaar NeoInt und Neo34, siehe Tabelle 3). Die

Primersequenzen sind in Tabelle 3 und der Reaktionsansatz der jeweiligen PCR in Tabelle 4 aufgeführt.

Beim Nachweis des TNFR2-Gens wurde eine Multiplex-PCR mit zwei Primerpaaren, jeweils zum Nachweis des TNFR2-Gens des Wildtyps (Primerpaar TNFR2neuA und TNFR2neuB, siehe Tabelle 3) und der Neomycin-Resistenz-Kassette (Primerpaar NeoInt und Neo34, siehe Tabelle 3) durchgeführt. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3 und der Reaktionsansatz der Multiplex-PCR ist in Tabelle 5 aufgeführt. Als Positivkontrolle sowohl für den Wildtyp- als auch für den *Knockout*-Nachweis diente in jedem Lauf jeweils ein sicher heterozygot getestetes TNFR1ko- bzw. TNFR2ko-Tier. Außerdem wurde in jedem Lauf eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher steriles Wasser anstelle von DNA eingesetzt wurde. Alle PCRs wurden unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95°C	15 Min.
35 Zyklen à (1 – 3):		
1. Denaturierung:	94°C	30 Sek.
2. Primeranlagerung:	65°C	60 Sek.
3. Elongation:	72°C	90 Sek.
Finale Elongation:	72°C	10 Min.

Anschließend wurden die PCR-Produkte der jeweiligen PCRs zusammen mit jeweils 2 µl *Midori Green Advance* (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf) auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Tabelle 3: Verwendete Primer für die PCR zum Nachweis des Gens für den TNFR1 bzw. TNFR2 bzw. der Neomycin-Resistenz-Kassette

Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge
<i>Sense</i> TNFR1-2883	CTC TCT TGT GAT CAG CAC TG	512 bp
<i>Antisense</i> TNFR1-4938	AGA AAT CTC AAG ACA ATT CTC TGC	
<i>Sense</i> TNFR2neuA	AGT GGC CCT GGT CCT TCC CG	437 bp
<i>Antisense</i> TNFR2neuB	GGA GCC ACC GCT GCC CCT AT	
<i>Sense</i> NeoInt	CGC CAA CCG GCT CCG TTC TT	660 bp
<i>Antisense</i> Neo34	TCC CGC TTC AGT GAC AAC GTC	

TNFR1: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1; TNFR2: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2; Neo: Neomycin-Resistenz-Kassette; bp: Basenpaare

Tabelle 4: Herstellung des Reaktionsansatzes für die TNFR1ko PCRs (jeweils separat für Primer 1 und 2 ansetzen)

Reagenz	Konz. Stammlsg.	Volumen	Konz. 15 µl PCR Ansatz
PCR Mastermix			
Qiagen Multiplex MM Puffer	2 x	7,9 µl	1 x
<i>Sense</i> Primer 1/ Primer 2	10 µM	0,8 µl/ 0,9 µl	500 nM/ 600 nM
<i>Antisense</i> Primer 1/ Primer 2	10 µM	0,8 µl/ 0,9 µl	500 nM/ 600 nM
Wasser		4,50 µl/ 4,30 µl	
15 µl PCR Ansatz			
Mastermix		14,00 µl	1 x
DNA		1,00 µl	2 ng/µl
Gesamt		15,00 µl	

Konz. Stammlsg.: Konzentration der Stammlösung; Konz. 15 µl PCR Ansatz: Konzentration in 15 µl PCR Ansatz; MM: Mastermix; *Sense* Primer 1: TNFR1-2883; *Antisense* Primer 1: TNFR1-4938; *Sense* Primer 2: NeoInt; *Antisense* Primer 2: Neo34

Tabelle 5: Herstellung des Reaktionsansatzes für die TNFR2ko Multiplex-PCR

Reagenz	Konz. Stammlsg.	Volumen	Konz. 15 µl PCR Ansatz
PCR Mastermix			
Qiagen Multiplex MM Puffer	2 x	7,9 µl	1 x
<i>Sense</i> Primer 1	10 µM	0,3 µl	200 nM
<i>Antisense</i> Primer 1	10 µM	0,3 µl	200 nM
<i>Sense</i> Primer 2	10 µM	0,9 µl	600 nM
<i>Antisense</i> Primer 2	10 µM	0,9 µl	600 nM
Wasser		3,70 µl	
15 µl PCR Ansatz			
Mastermix		14,00 µl	1 x
DNA		1,00 µl	2 ng/µl
Gesamt		15,00 µl	

Konz. Stammlsg.: Konzentration der Stammlösung; Konz. 15 µl PCR Ansatz: Konzentration in 15 µl PCR Ansatz; MM: Mastermix; *Sense* Primer 1: TNFR2neuA; *Antisense* Primer 1: TNFR2neuB; *Sense* Primer 2: NeoInt; *Antisense* Primer 2: Neo34

3.1.2. Herstellung der Virussuspension und der Mock-Gehirnsuspension

Zur Herstellung der BoDV-1-Virussuspension wurden 10 heterozygote TNF-transgene Mäuse neonatal mit einer mausadaptierten BoDV-1-Virussuspension (freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Staeheli, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abt. Virologie, Albert-

Ludwigs-Universität Freiburg zur Verfügung gestellt) intrazerebral infiziert und 36 Tage nach der Infektion (dpi) den behördlichen Auflagen entsprechend euthanasiert. Die Gehirne wurden steril entnommen, mittels einer sterilen Schere zunächst grob zerkleinert und dann in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM 1g/L D-Glukose, Gibco, Carlsbad, CA, USA) mit 2 % Hitze-inaktiviertem bovinem Serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) mit Hilfe eines Ultraschallstabs homogenisiert (pro Gramm Gehirn 10 ml DMEM). Das BoDV-1-Gehirnhomogenisat wurde dann bei 1600 x g für 20 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert, aliquotiert und bei -80°C zur weiteren Verwendung gelagert. Der Virustiter wurde freundlicherweise von Frau Dr. Sibylle Herzog, Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bestimmt. Der Virustiter der hergestellten BoDV-1-Virussuspension lag bei 5×10^5 ID₅₀/ml.

Die Mock-Gehirnsuspension wurde prinzipiell gleichartig, nur aus entsprechenden nicht infizierten Mäusen hergestellt. Für die Versuche in dieser Arbeit wurde auf noch vorhandene Mock-Suspension aus vorhergehenden Tierversuchen der eigenen Arbeitsgruppe (KRAMER, 2006; SCHAUDIEN, 2007) zurückgegriffen um die Anzahl an Versuchstieren zu minimieren.

3.1.3. Versuchsdurchführung und Versuchsablauf des *Borna disease virus* 1 (BoDV-1)-Infektionsversuchs

Für den Tierversuch wurden die Mäuse in Bio. A.S.[®] Typ III IVC (*individually ventilated cages*, Bioscience, Castrop-Rauxel) Käfigen mit einem erhöhtem Brett als Unterschlupf und zum Klettern, bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden, einer Temperatur von 21±1°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55±5 % gehalten. Die Fütterung erfolgte *ad libitum* mit konventionellen Pellets (LASQCDiet[®] Rod18-R und Rod16-R, LASVendi, Soest) und autoklaviertes und angesäuertes Wasser stand *ad libitum* aus Trinkflaschen zur Verfügung. Die Mäuse wurden zweimal täglich kontrolliert, wobei ein *Score Sheet* (siehe Anhang 8.3.1.) geführt wurde, welches mit Hilfe der (früheren) Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frau Dr. Saskia Peters, konzipiert wurde. Weiterhin wurden die Versuchstiere einmal wöchentlich gewogen (ab 21 dpi bzw. am Tag der Euthanasie). Die Mäuse der verschiedenen Stämme wurden neonatal (Tag 0) BoDV-1- oder Mock-infiziert bzw. nicht infiziert und entweder 21 oder 42 dpi entsprechend den behördlichen Auflagen euthanasiert (Tabelle 6). Neben diesen geplant euthanasierten Tieren kamen noch vier weitere BoDV-1-infizierte Mäuse zu den untersuchten Tieren hinzu (Tabelle 7), welche aufgrund von epileptiformen Krämpfen und/oder Verhaltensauffälligkeiten gemäß *Score Sheet* (siehe Anhang 8.3.1.) frühzeitig euthanasiert werden mussten (eine TNFR1ko Maus 29 dpi) bzw. plötzlich verstorben sind (drei TNFR2ko Mäuse 30, 37 bzw. 40 dpi). Zur klinischen Überwachung wurden gemäß dem Tierversuchsantrag tägliche Kontrollen mit Ausfüllen eines *Score Sheets* (siehe Anhang 8.3.1.) durchgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Versuchstiere und Tötungszeitpunkte

	Infektion	Tötungszeitpunkt (dpi)		
Mausstämme:	Tag 0	Tag 21	Tag 42	Gesamt
C57BL/6J tg/tg	BoDV	5	5	10
C57BL/6J tg/+		5	5	10
C57BL/6J wt		5	5	10
C57BL/6J TNFR1ko		5	5	10
C57BL/6J TNFR2ko		5	5	10
Gesamt				50
C57BL/6J tg/tg	MOCK	2	2	4
C57BL/6J tg/+		2	2	4
C57BL/6J wt		2	2	4
C57BL/6J TNFR1ko		2	2	4
C57BL/6J TNFR2ko		2	2	4
Gesamt				20
C57BL/6J tg/tg	KEINE	5	5	10
C57BL/6J tg/+		5	5	10
C57BL/6J wt		5	5	10
C57BL/6J TNFR1ko		5	5	10
C57BL/6J TNFR2ko		5	5	10
Gesamt				50

dpi: *days post infection*; tg/tg: homozygot TNF-transgen; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; wt: Wildtyp; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus 1*

Tabelle 7: Versuchstiere mit epileptiformen Krämpfen und/oder Verhaltensauffälligkeiten

	Infektion	Todeszeitpunkt (dpi)			
Mausstämme:	Tag 0	Tag 29	Tag 30	Tag 37	Tag 40
C57BL/6J TNFR1ko	BoDV	1	0	0	0
C57BL/6J TNFR2ko		0	1	1	1

dpi: *days post infection*; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus 1*

3.1.3.1. *Borna disease virus 1* (BoDV-1)- und Mock-Infektion

Die Mäuse wurden neonatal innerhalb der ersten 24 Lebensstunden (Tag 0) intrazerebral infiziert. Dazu wurden die Tiere kurzzeitig aus dem Käfig entnommen und manuell fixiert. Mit

Hilfe einer Hamilton® Spritze (26 Gauge, Hamilton Company, Bonaduz, Schweiz) wurde 1 µl körperwarmer Injektionslösung in die linke vordere Gehirnhälfte injiziert. Die Inokulationsstelle lag auf einer Verbindungslinie zwischen den lateralen Augenwinkeln links paramedian. Die Eindringtiefe wurde mittels eines Stoppers auf der Kanüle reguliert. Die Injektionslösung bestand aus der kurz zuvor 1:100 in 37°C warmem DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) verdünnten BoDV-1- bzw. Mock-Gehirnsuspension (siehe auch 3.1.2.).

3.1.3.2. Euthanasie und Probengewinnung

Die Euthanasie der Versuchsmäuse erfolgte mittels CO₂-Begasung in einem Bio. A.S.® Typ III IVC (Bioscape, Castrop-Rauxel) Käfig mit einer Flussrate von 6 l/Min. bis zum vollständigen Erliegen des Schwanz- und Zwischenzehenreflexes und Atemstillstand mit anschließender Dekapitation. Nach Desinfektion der Kopfhaut mit 70 %igem Ethanol wurde diese bis zur Nase nach rostral abgezogen. Die Schädelkalotte wurde ebenfalls mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und vom Foramen magnum ausgehend median mit einer sterilen Schere eröffnet und die beiden Seiten mit einer feinen, sterilen Pinzette nach außen weggeklappt. Das Gehirn wurde dann mit einem sterilen Löffel aus der Schädelkalotte geholt und auf eine sterile Glasscheibe verbracht. Dort wurde es mit einer sterilen Klinge sagittal in der Medianen geteilt und die linke Gehirnhälfte in 10 % nicht gepuffertem Formalin ca. 24 Stunden fixiert. Danach wurden die Gehirnhälften in drei Transversalebene zur Darstellung der Gehirnregionen Cortex cerebri (rostral), Striatum, Cortex cerebri (temporal), Hippocampus, Thalamus, Kleinhirn und Medulla oblongata geschnitten (Abb. 13) und in Paraffin eingebettet, entsprechend vorheriger Versuche der eigenen Arbeitsgruppe (KRAMER, 2006; SCHAUDIEN, 2007).

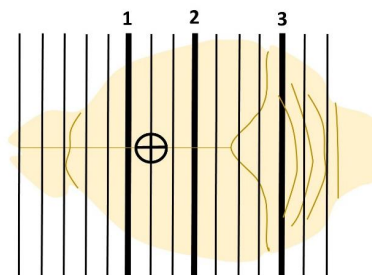


Abb. 13: Aufsicht auf ein adultes Mäusegehirn

(Schema in Anlehnung an *Neurogenetics at UT Health Science Center* © 1999 RW Williams, design by AG Williams, atlas by T Capra http://www.mbl.org/atlas170/atlas170_frame.html)

Balken = 1 mm; (x): Bregmapunkt; 1: Ebene 1 Bregma 1,34 mm; 2: Ebene 2 Bregma –2,18 mm; 3: Ebene 3 Bregma –5,88 mm

Für die histopathologischen und immunhistologischen Untersuchungen wurde das Gehirn in drei Transversalebene geschnitten (dicke schwarze Balken 1-3).

3.1.4. Histopathologische Untersuchungen

Es wurden 4 µm dicke Serienschnitte der unter 3.1.3. beschriebenen Gehirnnareale auf SuperFrost® Plus Objektträger (R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen) aufgezogen, getrocknet und den verschiedenen Färbungen bzw. immunhistologischen Untersuchungen unterzogen (siehe 3.1.4.1. und 3.1.5.).

3.1.4.1. Hämatoxylin/Hämalaun und Eosin (H&E)-Färbung

Die H&E-Färbung erfolgte automatisiert mit Hilfe eines Färbeautomaten (Micom, HMS 740; über Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nach einem Standardprotokoll (Romeis Mikroskopische Technik), wobei eine 4-minütige Inkubation in Kardasewitsch nach der Rehydrierung in der absteigenden Ethanolreihe eingefügt wurde (AESCHT *et al.*, 2010).

3.1.4.2. Histopathologische Auswertung

Die histopathologische Auswertung der H&E-Färbung im Hinblick auf die entzündlichen Veränderungen und die Astrozytenaktivierung erfolgte semiquantitativ nach den bereits veröffentlichten Scores vorhergehender Versuche der eigenen Arbeitsgruppe (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007).

Die Beurteilung der entzündlichen Veränderungen im gesamten Gehirn erfolgte bei 200facher Gesamtvergrößerung nach folgendem Score:

0 = keine Veränderungen

1 = vereinzelte Infiltrate (max. vier), nur wenige Gehirngebiete betroffen, perivaskulär maximal eine Schicht Entzündungszellen, bis zu fünf aktivierte Mikroglia das Entzündungszellinfiltrat umgebend

2 = sieben oder mehr Infiltrate, verschiedene Gehirnregionen betroffen, perivaskulär überwiegend ein bis zwei Zellschichten, bis zu 20 aktivierte Mikroglia das Entzündungszellinfiltrat umgebend

3 = in vielen Gehirnregionen perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate mit drei und mehr Zelllagen und Infiltration in der Umgebung der perivaskulären Infiltrate, deutliche Mikrogliaaktivierung mit mehr als 20 aktivierten Mikroglia das Entzündungszellinfiltrat umgebend

Die Beurteilung der Astrozytenaktivierung im gesamten Gehirn erfolgte bei 200facher und 400facher Gesamtvergrößerung nach folgendem *Score*:

0 = keine Veränderungen

1 = vereinzelte aktivierte Astrozyten in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate

2 = zahlreiche aktivierte Astrozyten in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate, teilweise mit degenerierten Zellkernen

3 = zahlreiche aktivierte Astrozyten in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate, häufig mit degenerierten Zellkernen

In manchen Fällen waren Übergänge dieser Einteilungen vorhanden, welche jeweils mit den Scores 0,5 bzw. 1,5 bzw. 2,5 eingestuft wurden.

Degenerative Veränderungen sind nicht in die jeweiligen semiquantitativen *Scores* miteingeflossen.

3.1.5. Immunhistologische Untersuchungen

Die Tiere der verschiedenen Mausstämme und Infektionsgruppen wurden immunhistologisch wie in Tabelle 8 dargestellt, mit Antikörpern gegen *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) zur Beurteilung der Astrozytenaktivierung, BoDV-1-Nukleoprotein (BoDV-N) zur Beurteilung der BoDV-1-Infektion, Glutamatttransporter 1 (GLT1) und Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) zur Beurteilung der Glutamatttransporterverteilung, aktivierter Caspase 3 zur Feststellung apoptotischer Zellen und *apoptosis inducing factor* (AIF) zur Feststellung von Zellen, welche den Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Weg des Zelltods eingeschlagen haben, untersucht.

Tabelle 8: Verwendete Mäuse und immunhistologische Nachweise von Antigenen

	Infektion	GFAP		BoDV-N		GLT1		GLAST		Aktiv. Casp. 3		AIF	
		Alter/DI (Tage)											
		21	42	21	42	21	42	21	42	21	42	21	42
Mausstämme:													
C57BL/6J tg/tg	BoDV	5	5	5	5	3	3	3	3	0	0	3	3
C57BL/6J tg/+		5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	3	3
C57BL/6J wt		5	5	5	5	3	3	3	3	0	0	3	3
C57BL/6J TNFR1ko		5	5	5	5	3	3	3	3	5	5	3	3
C57BL/6J TNFR2ko		5	5	5	5	3	3	3	3	5	5	3	3
C57BL/6J tg/tg	MOCK	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2	2
C57BL/6J tg/+		2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2
C57BL/6J wt		2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	2	2
C57BL/6J TNFR1ko		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C57BL/6J TNFR2ko		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C57BL/6J tg/tg	KEINE	5	5	0	0	3	3	3	3	0	0	3	3
C57BL/6J tg/+		5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
C57BL/6J wt		5	5	0	0	3	3	3	3	0	0	3	3
C57BL/6J TNFR1ko		5	5	0	0	3	3	3	3	5	5	3	3
C57BL/6J TNFR2ko		5	5	0	0	3	3	3	3	5	5	3	3

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; DI: Dauer der Infektion; BoDV-N: BoDV-1-Nukleoprotein; GLT1: Glutamattransporter 1; GLAST: Glutamat-Aspartat-Transporter; Aktiv. Casp. 3: Aktivierte (*cleaved*) Caspase 3; AIF: *apoptosis inducing factor*; tg/tg: homozygot TNF-transgen; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; wt: Wildtyp; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1

3.1.5.1. Antikörper, Seren und Kontrollen

Als Positivkontrollen für die verwendeten Primärantikörper (Tabelle 9) dienten Gewebe, welche die Marker exprimieren, wobei für GFAP, GLT1 und GLAST das Gehirn einer Maus verwendet wurde, im Falle von BoDV-N das Gehirn eines natürlich an *Borna disease* erkrankten Pferdes. Für den Nachweis der aktivierten Caspase 3 und AIF diente die Milz einer Maus als Positivkontrolle.

Als Negativkontrolle wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Lymphozyten vom Huhn, bzw. mit Kaninchen Immunglobulin-Fraktion (Dako, Hamburg) inkubiert, je nachdem ob es sich um einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper handelte.

Sämtliche Primär- und Sekundärantikörper sowie die Negativkontrollen wurden in 1 %igem bovinem Serumalbumin (BSA, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) aufgelöst in TBS (*Tris-buffered saline*) angesetzt. Die Blockseren wurden, wenn nötig, in TBS verdünnt.

Tabelle 9: Antikörper und verwendete Detektionssysteme für die Immunhistologie

Primär-antikörper	Verdün-nung	Herkunft	Block-serum	Vorbe-handlung	Sekundär-antikörper	Detek-tions-system
GFAP (Kaninchen, polyklonal)	1:500	Dako (Z0334)	20 % Schweine-serum	-	Schwein anti Kaninchen IgG	Kaninchen PAP
BoDV-N (Maus, monoklonal)	1:500	Dr. S. Herzog, Inst. für Virologie, JLU Gießen	Unverd. Pferde-serum	-	Biotinyl. Pferd anti Maus	ABC
GLT1 (Meersch., polyklonal)	1:500	Merck Millipore (AB1783)	5 % Ziegen-serum	-	Biotinyl. Ziege anti Meersch.	ABC
GLAST (Meersch., polyklonal)	1:2500	Merck Millipore (AB1782)	5 % Ziegen-serum	-	Biotinyl. Ziege anti Meersch.	ABC
Aktiv. Casp. 3 (Kaninchen, polyklonal)	1:500	Cell Signalling (Asp175 #9661)	5 % Ziegen-serum	Zitrat-puffer pH 6	Biotinyl. Ziege anti Kaninchen	ABC
AIF (Ziege, polyklonal)	1:100	Santa Cruz (D-20, sc- 9416)	Unverd. Pferde-serum	-	Biotinyl. Pferd anti Ziege	ABC

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; BoDV-N: BoDV-1-Nukleoprotein; GLT1: Glutamatttransporter 1; GLAST: Glutamat-Aspartat-Transporter; Aktiv. Casp. 3: Aktivierte (*cleaved*) Caspase 3; AIF: *apoptosis inducing factor*; Unverd.: unverdünnt; IgG: Immunglobulin G; Biotinyl.: biotinyliert; PAP: Peroxidase anti Peroxidase (Dako, Hamburg); ABC: Avidin-Biotin-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); JLU: Justus-Liebig-Universität; Meersch.: Meerschweinchen

3.1.5.2. Immunhistologie-Protokoll

Die immunhistologischen Untersuchungen wurden nach folgendem Protokoll für die verschiedenen Antikörper durchgeführt. Die jeweiligen Verdünnungen, Blockseren, Sekundärantikörper und Detektionssysteme sind in Tabelle 9 unter 3.1.5.1. aufgeführt.

MATERIAL UND METHODEN

1. Setzen der Schnitte in Glasküvetten und Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe wie folgt:

- | | | | |
|-------------------|--------|------------------|--------|
| a) Xylol Ersatz 1 | 3 Min. | e) Isopropanol 2 | 3 Min. |
| b) Xylol Ersatz 2 | 3 Min. | f) 96 % Ethanol | 3 Min. |
| c) Xylol Ersatz 3 | 3 Min. | g) 80 % Ethanol | 3 Min. |
| d) Isopropanol 1 | 3 Min. | | |

2. Hemmung der endogenen Peroxidase in Methanol (reinst) + 0,5 % H₂O₂ (30 %ig) bei Raumtemperatur für 30 Min.

3. Waschen 1 x 5 Min. in TBS

4. Vorbehandlung (falls nötig, siehe Tabelle 9): Zitratpuffer 10 mM, pH 6,0: Schnitte bei 99°C für 20 Min. inkubieren, danach ca. 15 Min. in der Lösung abkühlen lassen

5. Waschen 3 x 5 Min. in TBS

6. Einsetzen der Schnitte in *Shandon™ Racks* (*Shandon™ Slide Rack* und *Coverplates*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

7. Serum zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen auftragen (100 µl/Schnitt) und bei Raumtemperatur für 10 Min. inkubieren

8. Primärantikörper bzw. Negativkontrolle auf entsprechende Schnitte geben (100 µl/Schnitt) und mit Deckel bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubieren

9. Waschen 3 x 5 Min. in TBS

10. Sekundärantikörper auf Schnitte geben (100 µl/Schnitt) und bei Raumtemperatur 30 Min. inkubieren

11. Waschen 3 x 5 Min. in TBS

12. ABC (100 µl/Schnitt, muss ca. 30 Min. vor Gebrauch angesetzt werden) bzw. Kaninchen PAP (100 µl/ Schnitt) auftragen und bei Raumtemperatur 30 Min. inkubieren

13. Waschen 3 x 5 Min. in TBS

14. Umsetzen der Schnitte zurück in Glasküvetten

15. Schnitte unter langsamem Rühren (Magnetrührer) in frisch angesetztem 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aufgelöst in Imidazol-Puffer + 0,01 % H₂O₂ bei Raumtemperatur für 10 Min. inkubieren

16. Waschen 3 x 5 Min. in TBS

17. Waschen 1 x 5 Min. in destilliertem Wasser

18. Schnitte 5 Min. in Kardasewitsch inkubieren

19. Waschen 2 x 2,5 Min in destilliertem Wasser

20. Gegenfärben mit Papanicolaou (Merck KGaA, Darmstadt)-Gebrauchslösung ca. 30 – 40 Sek. je nach gewünschter Farbintensität

21. Schnitte in lauwarmem Leitungswasser 5 Min. bläuen

22. Waschen 1 x 5 Min. in destilliertem Wasser

23. Dehydrieren der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe wie folgt:

a) 50 % Ethanol	3 Min.	e) Isopropanol 1	3 Min.
b) 70 % Ethanol	3 Min.	f) Isopropanol 2	3 Min.
c) 80 % Ethanol	3 Min.	g) Xylol Ersatz 1	5 Min.
d) 96 % Ethanol	3 Min.	h) Xylol Ersatz 2	5 Min.

24. Umsetzen der Schnitte in Xylol und mit Eindeckautomat (Tissue-Tek® Coverslipper, Sakura Finetek GmbH, Staufen) eindecken

3.1.5.3. Immunhistologische Auswertung

Die immunhistologische Auswertung zum Nachweis von GFAP und BoDV-N erfolgte semiquantitativ in Anlehnung an Kramer und Schaudien (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007).

Die Auswertung der BoDV-N-Immunhistologie im gesamten Gehirn erfolgte bei 400facher Gesamtvergrößerung nach folgendem Score:

0 = kein Nachweis von BoDV-N

1 = in Herden < 80 Zellen/*high power field* (HPF) positive Zellen in einzelnen Gehirngebieten, keine Neuropilreaktion

2 = zahlreiche positive Zellen (< 150 Zellen/HPF), deutliche Neuropilreaktion, viele bis alle Gehirnregionen betroffen

3 = zahlreiche positive Zellen (> 150 Zellen/HPF), ausgeprägte Neuropilreaktion, alle untersuchten Gehirnregionen betroffen

Als positives Signal für BoDV-N wurde ein feinkörniges bis diffuses Präzipitat im Zytoplasma, Neuropil und/oder ein punktförmiges bis diffuses Präzipitat im Zellkern gewertet.

Die Auswertung der GFAP-Immunhistologie erfolgte im gesamten Gehirn bei 400facher Gesamtvergrößerung nach folgendem Score:

1 = < 30 positive Zellen/HPF, positive Reaktion vor allem im Cortex cerebri, Ammonshorn und Striatum

2 = 30-60 positive Zellen/HPF, einige Astrozyten mit deutlich vergrößertem Zellkern

3 = > 60 positive Zellen/HPF, einige Astrozyten mit deutlich vergrößertem Zellkern

Als positives Signal für GFAP wurde ein diffuses Präzipitat im Zytoplasma inklusive der astrozytären Fortsätze gewertet.

In manchen Fällen waren Übergänge dieser Einteilungen vorhanden, welche jeweils mit den Scores 0,5 bzw. 1,5 bzw. 2,5 eingestuft wurden.

Die Auswertung der GLT1-Immunhistologie im gesamten Gehirn erfolgte semiquantitativ bei 40facher und 100facher Gesamtvergrößerung, unter Beachtung der Stärke der Färbung des Präzipitats und der Verteilung des Präzipitats in den verschiedenen Gehirnregionen (wobei alle Schnitte in einem Durchgang unter gleichen Bedingungen und Inkubationszeiten behandelt wurden), nach folgendem Score:

1 = geringgradige, granuläre Reaktion, fleckig v.a. im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon und Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus; kaum Reaktion im Stratum moleculare des Kleinhirns

2 = mittelgradige, granuläre Reaktion, fleckig v.a. im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus und Rhombencephalon sowie diffus im Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus; fleckige Reaktion im Stratum moleculare des Kleinhirns

3 = hochgradige, granuläre Reaktion, diffus v.a. im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus und Rhombencephalon sowie im Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus und fleckig im Stratum moleculare des Kleinhirns

Die Auswertung der GLAST-Immunhistologie erfolgte semiquantitativ bei 40facher und 100facher Gesamtvergrößerung, unter Beachtung der Stärke der Färbung des Präzipitats und der Verteilung des Präzipitats in den verschiedenen Gehirnregionen (wobei alle Schnitte in einem Durchgang unter gleichen Bedingungen und Inkubationszeiten behandelt wurden), nach folgendem Score:

1 = geringgradige, granuläre Reaktion, fleckig v.a. im Cortex cerebri, Striatum und Rhombencephalon und diffus in Stratum moleculare des Hippocampus und Kleinhirns

2 = mittelgradige, granuläre Reaktion, fleckig v.a. im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus und Rhombencephalon sowie im Stratum subgranulare des Hippocampus und diffus im Stratum moleculare des Hippocampus und Kleinhirns

3 = hochgradige, granuläre Reaktion, fleckig bis diffus v.a. im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus und Rhombencephalon sowie im Stratum subgranulare des Hippocampus und diffus im Stratum moleculare des Hippocampus und Kleinhirns

Als positives Signal für GLT1 und GLAST wurde ein granuläres Präzipitat im Zytoplasma einschließlich zytoplasmatischer Fortsätze gewertet.

Die Auswertung der Caspase 3- und AIF-Immunhistologie erfolgte quantitativ, indem die Summe der positiven Zellen von jeweils 10 zufällig ausgewählten HPFs (*high power fields*, 400fache Gesamtvergrößerung) pro Gehirnregion (Cortex cerebri, Striatum, Ammonshorn, Thalamus, Cerebellum und Rhombencephalon) gebildet wurde und schließlich die Summe der AIF-positiven Zellen aus allen Gehirnregionen pro Tier ermittelt wurde. Als positives Signal für Caspase 3 wurde ein dunkelbraunes, feinkörniges Präzipitat im Zytoplasma von Zellen gewertet. Als positives Signal für AIF wurde ein dunkelbraunes, feinkörniges bis diffuses Präzipitat im Zellkern oder im Zellkern und Zytoplasma gewertet. Ein braunes Präzipitat im Zytoplasma allein wurde als negativ gewertet, da beim Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltod eine Translokation von AIF von den Mitochondrien in den Zellkern erfolgt.

3.1.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der histopathologischen und immunhistologischen Untersuchungen erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die bei der Auswertung

der histopathologischen Untersuchungen sowie der GFAP-, BoDV-N-, GLT1- und GLAST-Immunhistologie verwendete zwei- und dreifaktorielle Varianzanalyse wurde mit dem Statistikprogrammpaket BMDP/*Dynamic*, Release 8.1., Programm BMDP2V durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung der immunhistologischen Untersuchung zum Nachweis von aktivierter Caspase 3 und AIF wurde anstelle der Varianzanalyse eine multiple Poisson-Regression (mit Wald-Test im Falle von AIF) durchgeführt. Die Berechnung wurde mit dem Programm R (Version 3.2.3.), mit Hilfe der Funktion „glmm PQL“ aus dem *Package* MASS und „nlme“ durchgeführt. Bei einem zugrunde gelegten Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ wurden alle Ergebnisse mit einer Wahrscheinlichkeit (*probability*) von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Was die Altersgruppenzugehörigkeit betrifft, wurden für die statistische Auswertung stets die vier ungeplant verstorbenen bzw. euthanasierten Tiere (siehe 3.1.3), welche zwischen 21 und 42 Tage alt waren, der Gruppe der 42 Tage alten Tiere zugerechnet (in Diagrammen auch als „bis 42“ dargestellt), da es sich hierbei jeweils um Tiere gehandelt hat, welche geplant am 42. Lebenstag hätten euthanasiert werden sollen.

3.2. IN VITRO UNTERSUCHUNGEN

3.2.1. Präparation primärer kortikaler Astrozyten

Die Präparation primärer kortikaler Astrozyten erfolgte in Anlehnung an Ahlemeyer *et al.* 2013 sowie McCarthy und de Vellis 1980 (AHLEMEYER *et al.*, 2013; MCCARTHY and DE VELLIS, 1980). Es wurden kortikale Astrozyten aus wt-Mäusen, TNF-tg/tg-Mäusen, TNFR1ko-Mäusen und TNFR2ko-Mäusen präpariert, wobei pro Präparation ein gesamter Wurf (jedoch mindestens zwei Tiere) im Alter zwischen 0 und 2 Tagen verwendet wurde. Während der Präparation und im weiteren Verlauf der *in vitro* Versuche wurde als Medium DMEM (1 g/L D-Glukose, Gibco, Carlsbad, CA, USA), angesetzt mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalem bovinem Serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA) und 0,1 % Gentamicin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), im folgenden Protokoll nur noch DMEM genannt, verwendet.

Präparationsprotokoll primäre kortikale Astrozyten:

1. Dekapitation der Neonaten und Desinfektion der Kopfhaut mit 70 %igem Ethanol
2. Kopfhaut bis zur Nase nach rostral mit steriler chirurgischer Pinzette abziehen
3. Schädelkalotte mit 70 %igem Ethanol desinfizieren

4. Schädelkalotte vom Foramen magnum ausgehend median mit einer sterilen Schere eröffnen und die beiden Seiten mit einer feinen sterilen Pinzette nach außen wegklappen
5. Gehirn mit einem sterilen Löffel aus der Schädelkalotte entnehmen und auf eine sterile Petrischale mit Paraffin verbringen
6. Mit einer sterilen Klinge Kleinhirn und Hirnstamm abtrennen und Großhirn sagittal in der Medianen teilen
7. Falls noch vorhanden, Reste von Meningen und Meningealgefäßen mit einer feinen sterilen Pinzette abpräparieren
9. Cortex cerebri mit einer feinen gebogenen sterilen Pinzette abpräparieren und in eine kleine mit DMEM gefüllte Petrischale (*Cellstar Cell Culture Dishes*, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) geben bis alle Cortices präpariert sind
10. Pro Tier die beiden Cortices cerebri (je einer pro Großhirnhälfte) in ein mit 2 ml 0,25 % Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gefülltes steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml, Schraubverschluss, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführen und 20 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubieren (zwischendurch mehrmals Schütteln)
11. Röhrchen bei 194 x g 2 Min. bei Raumtemperatur zentrifugieren
12. Überstand des Trypsin-EDTAs vorsichtig mit Pipette absaugen und mit 1 ml DMEM durch Triturieren mit einer 1 ml Pipette resuspendieren
13. Zellsuspension durch steriles *Tissue Grinder Kit*[®] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit eingesetztem 200 mesh Netz in ein mit wenigen ml DMEM gefülltes steriles Glasgefäß pipettieren
14. Triturieren der Zellsuspension im Glasgefäß mit 1 ml Pipette und Überführen in neue sterile Zentrifugenröhrchen (maximal 6 ml pro 12 ml Röhrchen)
15. Röhrchen bei 194 x g 8 Min. bei Raumtemperatur zentrifugieren
16. Überstand vorsichtig mit Pipette absaugen und Zellpellet mit jeweils 3 ml DMEM durch Triturieren mit 1 ml Pipette resuspendieren

17. Zellsuspension eines Röhrchens in eine bereits mit 2 ml vorgewärmtem DMEM gefüllte 25 cm² Zellkulturflasche (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführen und bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank lagern

18. Am Folgetag nach der Präparation Medium abnehmen und Astrozyten mit kaltem *phosphate-buffered saline* (PBS) durch Schwenken waschen (5 ml pro 25 cm² Flasche) um nicht angeheftete Zelltrümmer zu entfernen und anschließend neues DMEM (5 ml pro 25 cm² Flasche) dazugeben

3.2.2. Borna disease virus 1 (BoDV-1)-Infektion von Astrozyten

Die BoDV-1-Infektion erfolgte nach 2 Tagen *in vitro* (*days in vitro*, DIV), indem die Virussuspension (aus 3.1.2.) 1:50 in DMEM verdünnt wurde. Das Medium in den Zellkulturflaschen wurde abgesaugt und 5 ml Virus-DMEM-Gemisch pro 25 cm² Flasche dazu gegeben und für 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert wurde. Anschließend wurde das Virus-DMEM-Gemisch abgenommen und durch frisches DMEM ersetzt.

3.2.3. Kontrolle der BoDV-1-Infektion und der Reinheit der Astrozytenkulturen

BoDV-1-infizierte und nicht infizierte Astrozyten jedes Mausstamms wurden bei Passage 1 (siehe auch 3.2.4.) auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml; Biochrom GmbH, Berlin) beschichtete Multitest-Objektträger (10 Kreise à 6 mm, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) in einem Verhältnis 1:1 (25 µl Zellsuspension und 25 µl DMEM) ausgesäht und nach 2-3 Tagen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in DMEM durch 20 Min. Inkubation bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von GFAP und BoDV-N durchgeführt (siehe 3.2.5.).

3.2.4. Versuchsaufbau MTT-Assay

Die Astrozyten wurden bis zur Konfluenz (6-9 DIV) in 25 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gehalten und dann in 96-Well-Plates (BD-Falcon™, Corning, Amsterdam, Niederlande), in einem Verhältnis von 35 µl Zellsuspension zu 75 µl DMEM (1:2,14) pro Well, passagiert. Das Passagieren erfolgte, indem die Astrozyten in den 25 cm² Zellkulturflaschen mit 1 ml 0,25 % Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) für 8 – 10 Min. im Brutschrank inkubiert wurden und die Reaktion nach mikroskopischer Kontrolle der vollständigen Ablösung der Astrozyten anschließend mit 5 ml DMEM gestoppt wurde. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml, Schraubverschluss, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) verbracht und bei 194 x g für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand

wurde dann abpipettiert und das Zellpellet mit 5 ml frischem DMEM durch Triturieren mit einer 1 ml Pipette resuspendiert.

Nach Erreichen der Konfluenz in den 96-*Well-Plates* wurden die Astrozyten mit verschiedenen Dosen TNF und/oder Glutamat behandelt (siehe 3.2.4.1.) bevor der eigentliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)-Assay durchgeführt wurde (siehe 3.2.4.2.).

3.2.4.1. Behandlung der Astrozyten mit TNF und Glutamat

Die Astrozyten in den 96-*Well-Plates* wurden nach Erreichen der Konfluenz (14-17 DIV) mit 5 mM bzw. 50 mM Glutamat (*L-Glutamic acid monosodium salt hydrate*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oder 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml bzw. 10 ng/ml TNF (recombinantes murines TNF- α , PeproTech® GmbH, Hamburg) oder mit Kombinationen aus den verschiedenen Glutamat- und TNF-Dosierungen (0,5 ng/ml TNF + 5 mM Glutamat, 1 ng/ml TNF + 5 mM Glutamat, 5 ng/ml TNF + 5 mM Glutamat, 10 ng/ml TNF + 5 mM Glutamat, 0,5 ng/ml TNF + 50 mM Glutamat, 1 ng/ml TNF + 50 mM Glutamat, 5 ng/ml TNF + 50 mM Glutamat, 10 ng/ml TNF + 50 mM Glutamat) für 24 Stunden behandelt (siehe Tabelle 10). Als Negativkontrollen dienten nicht behandelte Astrozyten, bei welchen lediglich zum gleichen Zeitpunkt ein Mediumwechsel mit DMEM (1 g/L D-Glukose, Gibco, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt wurde. Nach den 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die Zellen in den 96-*Well-Plates* bei -80°C bis zur Durchführung des MTT-Assays (siehe 3.2.4.2.) eingefroren.

Weiterhin wurden BoDV-1-infizierte und nicht infizierte Astrozyten verschiedener Mausstämmen bei Passage 1 (siehe auch 3.2.4.) auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml; Biochrom GmbH, Berlin) beschichtete Multitest-Objektträger (10 Kreise à 6 mm, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) in einem Verhältnis 1:1 (25 μ l Zellsuspension und 25 μ l DMEM) ausgesät und nach 2 Tagen mit 5 mM Glutamat, 10 ng/ml TNF oder einer Kombination aus beidem für 24 Stunden behandelt und anschließend 20 Min. mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in DMEM fixiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz zum Nachweis von GLT1, aktivierter Caspase 3, AIF, LC3 A/B, TNFR1, TNFR2 und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) durchgeführt (siehe Tabelle 11, 3.2.5.).

Tabelle 10: Anzahl der Astrozytenkultur-Präparationen mit Behandlung mit Glutamat und/oder TNF

Astrozyten aus Maus-stamm	Infektion	Glut. 5 mM	Glut. 5 mM	TNF 0,5 ng/ml	TNF 1 ng/ml	TNF 5 ng/ml	TNF 10 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 0,5 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 1 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 5 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 10 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 0,5 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 1 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 5 ng/ml	Glut. 5 mM + TNF 10 ng/ml
C57BL/6J tg/tg	KEINE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
C57BL/6J wt		4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3
C57BL/6J TNFR1ko		5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4
C57BL/6J TNFR2ko		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C57BL/6J tg/tg	BoDV	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C57BL/6J wt		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C57BL/6J TNFR1ko		3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
C57BL/6J TNFR2ko		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Glut.: Glutamat; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; tg/tg: homozygot TNF-transgen; wt: Wildtyp; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 knockout; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 knockout; BoDV: Borna disease virus 1

3.2.4.2. Durchführung des MTT-Assays

Zur Durchführung des MTT-Assays wurden die Astrozyten in den 96-Well-Plates aufgetaut und 5 mg/ml MTT-Lösung (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:10 in DMEM verdünnt (100 µl/Well) auf die Zellen gegeben und für 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die MTT-Lösung abgenommen und 100 µl/Well Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn) zum Lösen des Farbstoffs auf die Zellen gegeben und 1 Stunde bei 37°C bei leichtem Rütteln inkubiert. Die Reduktion des MTT-Farbstoffs wurde dann gemessen, indem die Absorption bei einer Test-Wellenlänge von 570 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 630 nm mittels dem Titertek Multiskan® PLUS MKII (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und dem Programm EIA (Version 3.10, ICN Biomedicals GmbH und Stefan Ufer, Eschwege) und dem Testprofil „Prolif“ bestimmt wurde.

3.2.4.3. Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse des MTT-Assays erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1. Die hier verwendete vierfaktorielle Varianzanalyse (mit Messwiederholungen im Faktor „Glutamat“- und „TNF“-Behandlung) wurde mit dem Programm BMDP2V durchgeführt. Bei einem zugrunde gelegten Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ wurden alle Ergebnisse mit einer Wahrscheinlichkeit (*probability*) von $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

3.2.5. Immunfluoreszenz

PFA-fixierte Astrozytenkulturen der verschiedenen Mausstämme und Infektionsgruppen wurden mittels Immunfluoreszenz wie in Tabelle 11 dargestellt mit Antikörpern zum Nachweis von GFAP zur Beurteilung der Astrozyten und zum Nachweis von BoDV-N zur Beurteilung der BoDV-1-Infektion untersucht. Weiterhin wurden ausgewählte mit Glutamat und/oder TNF vorbehandelte (siehe 3.2.4.1.), PFA-fixierte Astrozytenkulturen von verschiedenen Mausstämmen und Infektionsgruppen wie in Tabelle 11 dargestellt mit Antikörpern zum Nachweis des Glutamattransporters 1 (GLT1) zur Beurteilung der Glutamattransporterexpression, aktivierter Caspase 3 zur Feststellung apoptotischer Zellen, des *apoptosis inducing factors* (AIF) zur Feststellung von Caspase-unabhängigem PARP1- und AIF-vermitteltem Zelltod, des *microtubule-associated proteins 1A/1B-light chain 3* (LC3 A/B) zur Beurteilung von Autophagie, des TNFR1 und TNFR2 zur Beurteilung der TNFR-Expression sowie zum Nachweis des *proliferating cell nuclear antigens* (PCNA) zur Untersuchung der Proliferationsaktivität exemplarisch untersucht. Als Negativkontrolle

wurden jeweils sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper durch TBS ersetzt. Im Falle von BoDV-N wurden jeweils immer sicher nicht BoDV-1-infizierte Astrozyten als Kontrolle mitgeführt. Die Zellkerne wurden jeweils mit 4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride (DAPI, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in einer finalen Konzentration von 10 µg/ml aufgelöst in TBS gegengefärbt.

Tabelle 11: Verwendete Astrozytenkulturen und Nachweise in der Immunfluoreszenz

Astrozyten aus Mausstamm	Infektion	GFAP	BoDV-N	GLT1	Aktiv. Casp. 3	AIF	LC3 A/B	TNF R1	TNF R2	PCNA
C57BL/6J tg/tg	KEINE	X	X	X	X	X	X	X	X	X
C57BL/6J wt		X	X	-	-	-	-	-	-	X
C57BL/6J TNFR1ko		X	X	-	X	X	X	-	-	-
C57BL/6J TNFR2ko		X	X	-	-	-	-	-	-	-
C57BL/6J tg/tg	BoDV	X	X	-	-	-	-	-	-	-
C57BL/6J wt		X	X	-	X	X	X	-	-	X
C57BL/6J TNFR1ko		X	X	-	-	-	-	-	-	-
C57BL/6J TNFR2ko		X	X	-	-	-	-	-	-	-

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; BoDV-N: BoDV-1-Nukleoprotein; GLT1: Glutamatransporter 1; Aktiv. Casp. 3: Aktivierte (*cleaved*) Caspase 3; AIF: *apoptosis inducing factor*; LC3 A/B: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*; PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*; tg/tg: homozygot TNF-transgen; wt: Wildtyp; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus 1*

3.2.5.1. Antikörper und Seren

Sämtliche Primär- und Sekundärantikörper wurden in 1 %igem bovinem Serumalbumin (BSA, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) aufgelöst in TBS angesetzt. Die Blockseren wurden, wenn nötig, in TBS verdünnt.

Tabelle 12: Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Primär-antikörper	Verdünnung	Herkunft	Blockserum	Vorbehandlung	Sekundär-antikörper	Herkunft
GFAP (Kaninchen, polyklonal)	1:50	Dako (Z0334)	5 % Ziegen- serum	0,25 % Triton® X- 100	Cy2 Ziege anti Kaninchen IgG	Dianova (111-225- 003)
BoDV-N (Maus, monoklonal)	1:100	Dr. S. Herzog, Inst. für Virologie, JLU Gießen	5 % Ziegen- serum	0,25 % Triton® X- 100	Cy3 Ziege anti Maus IgG	Dianova (115-165- 003)
GLT1 (Meersch., polyklonal)	1:500	Merck Millipore (AB1783)	5 % Ziegen- serum	-	Cy2 Ziege anti Meersch. IgG	Dianova (106-225- 003)
Aktiv. Casp. 3 (Kaninchen, polyklonal)	1:100	Cell Signalling (Asp175 #9661)	5 % Ziegen- serum	0,25 % Triton® X- 100	Cy2 Ziege anti Kaninchen IgG	Dianova (111-225- 003)
AIF (Ziege, polyklonal)	1:50	Santa Cruz (D-20, sc- 9416)	1 % BSA in TBS	0,25 % Triton® X- 100	Cy3 Kaninchen anti Ziege IgG	Dianova (305-165- 003)
LC 3 A/B (Kaninchen, polyklonal)	1:50	Abcam (ab58610)	5 % Ziegen- serum	0,25 % Triton® X- 100	Cy2 Ziege anti Kaninchen IgG	Dianova (111-225- 003)
TNFR1 (Ziege, polyklonal)	1:50	Santa Cruz (E-20, sc- 1070)	1 % BSA in TBS	-	Cy3 Kaninchen anti Ziege IgG	Dianova (305-165- 003)
TNFR2 (Ziege, polyklonal)	1:50	Santa Cruz (L-20, sc- 1074)	1 % BSA in TBS	-	Cy3 Kaninchen anti Ziege IgG	Dianova (305-165- 003)
PCNA (Maus, monoklonal)	1:50	Dako (M0879)	5 % Ziegen- serum	0,25 % Triton® X- 100	Cy3 Ziege anti Maus IgG	Dianova (115-165- 003)

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; BoDV-N: BoDV-1-Nukleoprotein; GLT1: Glutamatransporter 1; Aktiv. Casp. 3: Aktivierte (*cleaved*) Caspase 3; AIF: *apoptosis inducing factor*; LC 3 A/B: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*; TNFR1: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1; TNFR2: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2; PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*; BSA: bovines Serumalbumin; TBS: *Tris-buffered saline*; Cy: Cyanin; IgG: Immunglobulin G; JLU: Justus-Liebig-Universität; Meersch.: Meerschweinchen

3.2.5.2. Immunfluoreszenz-Protokoll

Die Immunfluoreszenz wurde an mit 4 % PFA in DMEM für 20 Min. fixierten Astrozyten auf Multitest-Objektträgern (10 Kreise à 6 mm, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) nach folgendem Protokoll für die verschiedenen Antikörper durchgeführt. Die jeweiligen

Verdünnungen, Blockseren und Sekundärantikörper sind in Tabelle 12 unter 3.2.5.1. aufgeführt.

1. Waschen 2 x 5 Min. in kaltem TBS
2. Permeabilisierung der Zellen (falls nötig, siehe Tabelle 12) mit 0,25 % Triton® X-100 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) in TBS bei Raumtemperatur für 10 Min.
3. Waschen 3 x 5 Min. in TBS
4. Serum zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen auftragen (25 µl/Well) und bei Raumtemperatur 30 Min. inkubieren
5. Primärantikörper auftragen (25 µl/Well) und bei 4°C über Nacht in feuchter Kammer inkubieren
6. Waschen 3 x 5 Min. in TBS
7. Sekundärantikörper auftragen (25 µl/Well) und im Dunkeln bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubieren
8. Waschen 3 x 5 Min. im Dunkeln in TBS
9. 10 µg/ml DAPI (25 µl/Well) auftragen und im Dunkeln bei Raumtemperatur 5 Min. inkubieren
10. Waschen 1 x 5 Min. im Dunkeln mit TBS
11. Waschen 1 x 5 Min. im Dunkeln in destilliertem Wasser
12. Eindecken der Multitestobjektträger per Hand mit Entellan® (Merck, Darmstadt)

3.2.5.3. Immunfluoreszenz-Auswertung

Zur Auswertung der GFAP- und BoDV-N-Immunfluoreszenz wurden pro Mausstamm aus jeweils 3 Präparationen insgesamt 200 Zellen in 200facher Gesamtvergrößerung zufällig gezählt (zur Verblindung wurde hierzu lediglich die DAPI-Kernfärbung genutzt). Anschließend wurden von diesen Zellen die jeweils GFAP-positiven bzw. BoDV-N-positiven Zellen gezählt, der prozentuale Anteil errechnet und aus den Prozentzahlen der 3 Präparationen der

arithmetische Mittelwert gebildet. Als BoDV-N-positiv wurde ein punktförmiges bis granuläres Signal im Zellkern und/oder ein punktförmiges bis granulär-diffuses Signal im Zytoplasma gewertet. Als positives Signal für GFAP wurde ein diffuses Signal im Zytoplasma gewertet. Die Auswertung der GLT1-, Caspase 3-, AIF-, LC3 A/B-, TNFR1-, TNFR2- und PCNA-Immunfluoreszenz erfolgte quantitativ, indem die Summe der positiven Zellen pro Gesamtzahl an Astrozyten in jeweils 8 Gesichtsfeldern in 200facher Gesamtvergrößerung gebildet wurde. Als positives Signal für GLT1, TNFR1 und TNFR2 wurde ein körniges bis fein punktförmiges Signal im Zytoplasma und in der Zellmembran von Zellen gewertet. Als positives Signal für Caspase 3 wurde ein scholliges Signal im Zytoplasma gewertet. Als positives Signal für AIF wurde ein körniges bis fein punktförmiges Signal im Zellkern oder im Zellkern und Zytoplasma gewertet. Ein alleiniges Signal im Zytoplasma wurde als negativ gewertet, da beim Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltod eine Translokation von AIF von den Mitochondrien in den Zellkern erfolgt. Als positives Signal für LC3 A/B wurde ein punktförmiges Signal im Zytoplasma und Zellkern gewertet. Als positives Signal für PCNA wurde ein punktförmiges Signal im Zellkern gewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1. IN VIVO UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

4.1.1. Klinische Symptome

Insgesamt kam es zwischen den für diese Studie verwendeten Untersuchungszeitpunkten zu sieben ungeplanten Versuchsabbrüchen, ausschließlich bei BoDV-1-infizierten Tieren, wobei von vier Tieren Untersuchungsmaterial in die Untersuchungen mit einfluss (siehe 3.1.3. Tabelle 7). Daneben zeigten vereinzelte Tiere aus verschiedenen Gruppen Auffälligkeiten in der Gewichtsentwicklung, dem Spontanverhalten und/oder dem Allgemeinbefinden, was zur Vergabe von *Scores* (*Score Sheet* siehe Anhang 8.3.1.) geführt hat, jedoch keinen Versuchsabbruch zur Folge hatte.

In der Gruppe der **TNFR1ko-Mäuse** musste eine BoDV-1-infizierte Maus (MR-R1-Nr. 32-V316/14) 29 dpi wegen Verhaltensauffälligkeiten mit gesteigerter Aggressivität und Schreckhaftigkeit (*Score* 1 Spontanverhalten), Gewichtsabweichung von 10 – 25 % (*Score* 5 – 10 Körpergewicht) ab 21 dpi sowie final gekrümmtem Rücken mit gesträubtem Fell (*Score* 20 Allgemeinbefinden) euthanasiert werden. Weiterhin fielen drei BoDV-1-infizierte TNFR1ko-Tiere ab 25 dpi mit 10 – 25 % Gewichtsabweichung (*Score* 5 – 10 Körpergewicht) im Vergleich zu den erwarteten Gewichten dieser Mausgruppe auf (MR-R1-Nr. 5-V256/14, MR-R1-Nr. 7-V257/14 und MR-R1-Nr. 10-V260/14), sowie 2 weitere Tiere ab 20 dpi zusätzlich neben ähnlicher Gewichtsabweichung mit geringgradig gesträubtem Fell und geringgradiger Abweichung vom Spontanverhalten (jeweils *Score* 1 Spontanverhalten und Allgemeinbefinden) (MR-R1-Nr. 8-V258/14 und MR-R1-Nr 9-V259/14).

In der Gruppe der **TNFR2ko-Mäuse** sind drei BoDV-1-infizierte Mäuse plötzlich verstorben, wovon eine infolge eines generalisierten epileptiformen Krampfanfalls 30 dpi ohne andere vorherige Auffälligkeiten verstarb (MR-R2-Nr. 33-V67/14). Ein weiteres Tier wurde 40 dpi ohne vorherige Auffälligkeiten mit struppigem Fell, steifen gestreckten Hinterbeinen und gekrümmtem Rücken morgens tot im Käfig vorgefunden (MR-R2-Nr. 48-V306/14; Abb. 14). Eine weitere Maus lag 37 dpi morgens ebenfalls mit steifen gestreckten Hintergliedmaßen tot im Käfig (MR-R2-Nr. 30-V63/14), nachdem sie ab 35 dpi mit Gewichtsabweichung von 5 – 10 % (*Score* 1 Körpergewicht), stumpfem Fell sowie Verhaltensauffälligkeiten mit gesteigerter Aggressivität, Hyperaktivität und Schreckhaftigkeit (*Score* 5 Allgemeinzustand und Spontanverhalten) auffiel (siehe auch Tabelle 7). Der epileptiforme Krampfanfall der

betroffenen TNFR2ko-Maus (MR-R2-Nr. 33-V67/14) konnte durch Videoaufzeichnungen in vier Phasen unterteilt werden. Er fing an, indem sich die Maus zunächst normal putzte, dann jedoch plötzlich kurz verharrte und mit steif nach oben gestrecktem Schwanz auf den Hinterbeinen sitzen blieb (initiale Phase/Aura). Aus dieser Position fiel die Maus zunächst zur Seite, setzte sich dann wieder aufrecht und zeigte wenige Sekunden lang Zittern, Zuckungen und einen leicht nach oben gestreckten Kopf mit Ruderbewegungen der Vordergliedmaßen (Tremorphase). Dies ging abrupt in wildes Umherspringen quer durch den gesamten Käfig über, was gut 10 Sekunden andauerte (Iktus), bevor das Tier in einer Käfigecke gestreckt in Seitenlage liegen blieb (tonische Phase) und schließlich verstarb.



Abb. 14: BoDV-1-infizierte TNFR2ko Maus (MR-R2-Nr. 48-V306/14), tot aufgefunden 40 dpi

Struppiges Fell, gekrümmter Rücken und steife, gestreckte Hintergliedmaßen bei einer ohne vorherige Auffälligkeiten gestorbenen 40 Tage alten TNFR2ko-Maus.

Eine weitere BoDV-1-infizierte TNFR2ko-Maus (MR-R2-Nr. 26-V62/14) fiel 28 dpi mit 20 – 25 % Gewichtsabweichung (*Score* 10 Körpergewicht) im Vergleich zu den erwarteten Gewichten dieser Mausgruppe sowie kauender Körperhaltung, leicht struppigem Fell und einer geringgradig aufgewölbten Schädelkalotte auf (*Score* 1 Allgemeinbefinden und Spontanverhalten) und wurde euthanasiert. Bei der Sektion und histologischen Untersuchung des Gehirns konnte ein hochgradiger Hydrocephalus internus ohne weitere entzündliche oder andere degenerative Veränderungen festgestellt werden. Aufgrund der fehlenden entzündlichen Veränderungen, handelte es sich hierbei sehr wahrscheinlich nicht um eine mit der BoDV-1-Infektion und dem Versuchsziel in Verbindung stehende Veränderung, weswegen das Tier nicht in die Auswertung mit einbezogen wurde. Daneben fiel unter den BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäusen ein Tier (MR-R2-Nr. 34-V204/14) mit geringgradig gesträubtem Fell (*Score* 1 Allgemeinbefinden) 41 dpi auf. Ein weiteres Tier (MR-R2-Nr. 35-V205/14) fiel am Sektionstag 42 dpi mit über 25 % Gewichtsabweichung (*Score* 20 Körpergewicht) im Vergleich zum erwarteten Gewicht dieser Mausgruppe auf und ein Tier (MR-R2-Nr. 28-V65/14) ab 35 dpi mit 5 – 10 % Gewichtsabweichung (*Score* 1 Körpergewicht) im Vergleich zu den erwarteten

Gewichten dieser Mausgruppe sowie mit gesteigertem Putzverhalten, Hyperaktivität und Aggressivität (*Score* 1 Allgemeinbefinden und *Score* 5 – 10 Spontanverhalten).

Bei den **TNF-tg/tg-Mäusen** kam es unter den BoDV-1-infizierten Tieren zu zwei plötzlichen Todesfällen. Eine Maus (MR-Nr. 107) fiel bereits 21 dpi mit verminderter Gewichtsentwicklung (*Score* 5 Körpergewicht), bei jedoch normalem Spontanverhalten auf und wurde 24 dpi morgens tot im Käfig aufgefunden. Die andere Maus (MR-Nr. 91) wurde ohne beobachtete vorherige Auffälligkeiten 25 dpi morgens tot im Käfig aufgefunden (beide Tiere in normaler, nicht gestreckter Körperhaltung nach Aussage der Tierpfleger). Es konnte leider kein Untersuchungsmaterial dieser Tiere gewonnen werden und es liegen keine Videoaufzeichnungen dieser Tiere vor. Ein Zusammenhang mit der BoDV-1-Infektion und damit einhergehender entzündlicher Veränderungen sowie potentiellen epileptiformen Krämpfen ist möglich.

Ebenfalls unter den BoDV-1-infizierten Tieren fiel eine **wt-** und eine **TNF-tg/+Maus** ab 35 dpi mit 10 – 20 % Gewichtsabweichung (*Score* 5 Körpergewicht) im Vergleich zu den erwarteten Gewichten dieser Mausgruppen auf (MR-Nr. 95-V75/13 und MR-Nr. 98-V78/13).

In der Gruppe der **Mock-infizierten Tiere** fielen zwei TNFR1ko-Mäuse (MR-R1-Nr. 37-V331/14 und MR-R1-Nr. 39-V332/14) am Sektionstag 42 dpi mit 5 – 10 % Gewichtsabweichung (*Score* 1 Körpergewicht) im Vergleich zu den erwarteten Gewichten dieser Mausgruppe auf.

Die detaillierten statistischen Auswertungen und Ergebnisse der klinischen Untersuchungen, inklusive der Gewichtskurven der verschiedenen Versuchstiere, sind Teile anderer Doktorarbeiten und werden aus diesem Grund hier nicht weiter ausgeführt. Der Aufbau des verwendeten *Score Sheets* zur Dokumentation der klinischen Überwachung der Mäuse befindet sich im Anhang (siehe 8.3.1.).

4.1.2. Histopathologie

Sämtliche nicht infizierten und Mock-infizierten Mäuse aller Mausstämme (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko) wiesen keine entzündlichen Veränderungen und sämtliche Mock-infizierten Mäuse aller Mausstämme (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko) wiesen keine Astrozytenaktivierung auf. Auf die Auswertung der Astrozytenaktivierung bei sämtlichen nicht infizierten Mäusen wurde verzichtet, da keine Veränderungen zu erwarten waren. Die Mock-infizierten Mäuse aller Mausstämme dienten als qualitative Negativkontrolle der intrazerebralen BoDV-1-Infektion, daher wurden diese Tiere auch spezifisch auf das

Vorhandensein entzündlicher Veränderungen und Astrozytenaktivierung untersucht (siehe auch Anhang 8.3.2.).

4.1.2.1. Entzündliche und degenerative Veränderungen

Alle Mäuse wurden histologisch in der H&E-Färbung mit besonderem Augenmerk auf entzündliche Veränderungen im Gehirn untersucht (Abb. 15-18, siehe auch 3.1.4.2. und Anhang 8.3.2.). Daneben fanden sich auch degenerative Veränderungen wie Vakuolisierungen (Abb. 19) oder vereinzelt Auftreten eines Hydrocephalus internus. Diese degenerativen Veränderungen werden im folgenden Abschnitt beschrieben, sind aber nicht in die semiquantitative Auswertung, welche sich rein auf die entzündlichen Veränderungen bezieht, miteingeflossen (siehe auch 3.1.4.2.).

Aus der **nicht infizierten** und **Mock-infizierten** Gruppe (siehe Anhang 8.3.2.) zeigten keine Mäuse zu den Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 Tage entzündliche Veränderungen im Gehirn.

In der Gruppe der **BoDV-1-infizierten** Tiere (Abb. 15-16) zeigten die **wt-Mäuse** zu keinem Zeitpunkt entzündliche Veränderungen, jedoch fiel 42 dpi bei vier Tieren eine geringgradige Vakuolisierung der grauen und weißen Substanz im Thalamus bzw. bei einem Tier im Thalamus und Rhombencephalon auf.

Die **BoDV-1-infizierten TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäuse** zeigten 21 dpi eine miteinander vergleichbare geringgradige, perivaskuläre, mononukleäre Entzündungszellinfiltration, vor allem im Cortex cerebri, bei vereinzelt Tieren auch im Striatum oder Thalamus. Mit 42 dpi war eine mittelgradige Entzündungszellinfiltration bei den TNF-tg/+-Mäusen vorhanden welche sich vor allem im Cortex cerebri und Striatum bzw. Thalamus zeigte, wobei vier Mäuse jetzt auch geringgradige, fokale bis multifokale Infiltrate in der Meninx zeigten und bei allen fünf Mäusen fiel eine geringgradige Vakuolisierung der grauen und weißen Substanz im Thalamus bzw. bei zwei Tieren zusätzlich auch im Rhombencephalon auf. Bei den TNF-tg/tg-Mäusen war die Entzündungszellinfiltration 42 dpi mittel- bis hochgradig und meist in Cortex cerebri, Thalamus und Striatum sowie vereinzelt auch im Ammonshorn zu finden, wobei zwei Mäuse jetzt auch geringgradige, multifokale Meninxinfiltrate zeigten und bei vier Mäusen fiel eine geringgradige Vakuolisierung der grauen und weißen Substanz im Thalamus (Abb. 19, links) bzw. bei einem Tier zusätzlich auch im Striatum auf.

Bei den **BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäusen** zeigten sich 21 dpi keine entzündlichen Veränderungen, jedoch hatte ein Tier einen geringgradigen Hydrocephalus internus. Mit 42

dpi zeigten sich nur ganz dezente entzündliche Veränderungen in Form von ganz geringgradigen, fokalen, mononukleären Meninxinfiltraten bei zwei Tieren. Bei vier Tieren fiel eine geringgradige Vakuolisierung der grauen und weißen Substanz im Thalamus bzw. bei einem Tier zusätzlich auch im Rhombencephalon auf. Die vorzeitig mit 29 dpi aufgrund von Auffälligkeiten (siehe 4.1.1.) euthanasierte BoDV-1-infizierte TNFR1ko-Maus (MR-R1-Nr. 32-V316/14) stach hier deutlich hervor mit mittelgradigen, perivaskulären, mononukleären Entzündungszellinfiltraten im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Ammonshorn und Kleinhirn (Abb. 17, links), mittelgradiger, diffuser, mononukleärer Meningitis (Abb. 18, links) und geringgradigem Hydrocephalus internus. Weiterhin fiel eine deutliche Unregelmäßigkeit und Auflockerung der Neurone in der *Cornu ammonis* (CA)3-Region des Hippocampus mit hypereosinophilen geschrumpften Neuronen (Neuronennekrosen) und eine Vakuolisierung der grauen und weißen Substanz im Thalamus und Rhombencephalon (Abb. 19, rechts) auf.

Bei den **BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäusen** zeigten sich 21 dpi geringgradige, mononukleäre Entzündungszellinfiltrate bei vier Tieren, welche bei drei Tieren lediglich fokal in der Meninx zu finden waren und bei einem weiteren Tier lag ein einzelnes Infiltrat im Striatum vor. Eines der Tiere mit fokalem Meninxinfiltrat hatte zusätzlich einen Hydrocephalus internus. Am 42. Tag nach der Infektion zeigten keine der TNFR2ko-Mäuse entzündliche Veränderungen, jedoch fiel bei vier Tieren eine geringgradige Vakuolisierung der grauen und weißen Substanz im Thalamus und Rhombencephalon sowie bei einem weiteren Tier nur im Thalamus auf. Die Gehirne der drei untersuchten gestorbenen TNFR2ko-Mäuse (MR-R2-Nr. 30-V63/14, MR-R2-Nr. 33-V67/14 und MR-R2-Nr. 48-V306/14) waren alle gering- bis mittelgradig postmortal verändert. Am auffälligsten und gleichzeitig auch am wenigsten postmortal verändert war das Gehirn der mit 30 dpi an einem generalisierten epileptiformen Krampfanfall gestorbenen Maus (MR-R2-Nr. 33-V67/14; siehe 4.1.1.), welches mittelgradige, multifokale, perivaskuläre, mononukleäre Entzündungszellinfiltrate (Abb. 17, rechts) v.a. im Cortex cerebri und Thalamus und vereinzelt auch im Striatum sowie eine geringgradige, diffuse, mononukleäre Meningitis (Abb. 18, rechts) und einen geringgradigen Hydrocephalus internus zeigte. Weiterhin fiel eine deutliche Unregelmäßigkeit und Auflockerung der Neurone in der CA3-Region des Hippocampus mit vereinzelt hypereosinophilen geschrumpften Neuronen (Neuronennekrosen) auf. Die 40 dpi mit struppigem Fell, gekrümmtem Rücken und gestreckten Hintergliedmaßen tot aufgefundene Maus (MR-R2-Nr. 48-V306/14; siehe 4.1.1.) zeigte dezente, multifokale, mononukleäre Entzündungszellinfiltrate in der Meninx. Weiterhin fielen eine dezente Unregelmäßigkeit mit Auflockerung der Neurone in der CA3-Region des Hippocampus und eine geringgradige Vakuolisierung der grauen und weißen Substanz im Thalamus auf. Das Gehirn der mit 37 dpi mit stumpfem Fell und gestreckten Hintergliedmaßen sowie nach Verhaltensauffälligkeiten tot aufgefundenen Maus (MR-R2-Nr. 30-V63/14; siehe

4.1.1.) zeigte keine entzündlichen Veränderungen, war jedoch auch am stärksten postmortal verändert. Es fiel allerdings auch hier eine geringgradige Unregelmäßigkeit und Auflockerung der Neurone in der CA3-Region des Hippocampus auf.

Insgesamt fanden sich bezüglich der entzündlichen Veränderungen zwischen den Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko), den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen sowie zwischen den beiden Altersgruppen 21 und 42 Tage bzw. der Infektionsdauer 21 und 42 dpi jeweils statistisch hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$; siehe Tabelle 13). So zeigten die BoDV-1-infizierten Tiere hochsignifikant stärkere entzündliche Veränderungen als die nicht infizierten Tiere. Ebenso zeigten die TNF-transgenen Mäuse hochsignifikant stärkere entzündliche Veränderungen als die wt-Mäuse, welche keine entzündlichen Veränderungen zeigten. Weiterhin zeigten die 42 Tage alten Mäuse aller Gruppen hochsignifikant stärkere entzündliche Veränderungen als die 21 Tage alten Mäuse. Die entzündlichen Veränderungen nahmen demnach hochsignifikant mit der BoDV-1-Infektion (BoDV-1-infiziert > nicht infiziert und Mock-infiziert), der Infektionsdauer (42 dpi > 21 dpi) und der Veränderung des TNF-Systems (TNF-tg/tg > TNF-tg/+ > wt sowie TNFR1ko und TNFR2ko > wt) zu. Weiterhin lagen auch statistisch hochsignifikante ($p \leq 0,0001$) Zwei- und Dreifachwechselwirkungen zwischen allen Parameterkombinationen vor (siehe Tabelle 13). Das bedeutet, dass sowohl hochsignifikante Wechselwirkungen zwischen Mausstamm und Infektionsstatus (nicht infiziert oder BoDV-1-infiziert) als auch zwischen Mausstamm und Alter bzw. Infektionsdauer der Tiere und zwischen Alter der Tiere und Infektionsstatus vorlagen sowie auch zwischen allen drei Parametern Mausstamm, Infektionsstatus und Alter der Tiere. So zeigten BoDV-1-infizierte TNF-transgene sowie TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse hochsignifikant stärkere entzündliche Veränderungen als BoDV-1-infizierte wt-Mäuse. Innerhalb der nicht infizierten Gruppe, verhielten sich die wt- und TNF-transgenen sowie TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse jedoch gleichartig und zeigten jeweils keine entzündlichen Veränderungen. Ebenfalls zeigten BoDV-1-infizierte 42 Tage alte Mäuse aller Gruppen hochsignifikant stärkere entzündliche Veränderungen als 21 Tage alte BoDV-1-infizierte Mäuse, wobei diese altersabhängige bzw. von der Infektionsdauer abhängige Zunahme nicht bei den nicht infizierten Mäusen vorlag. Unter den BoDV-1-infizierten Mäusen, im Gegensatz zu den nicht infizierten Mäusen, zeigten wiederum die TNF-transgenen 42 Tage alten Mäuse hochsignifikant stärkere entzündliche Veränderungen als die 42 Tage alten wt-Mäuse bzw. als die 21 Tage alten TNF-transgenen Mäuse (Abb. 15).

ERGEBNISSE

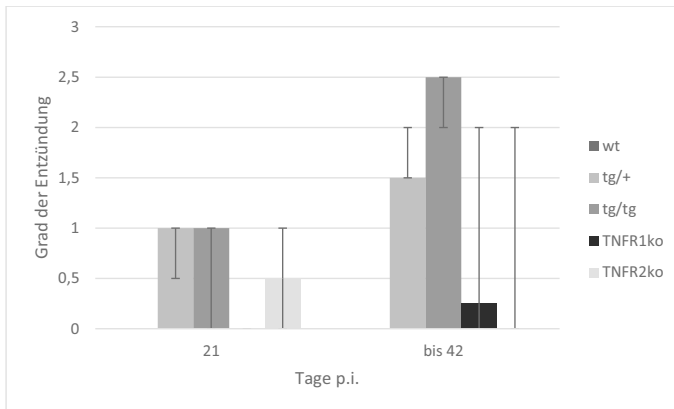


Abb. 15: Entzündliche Veränderungen bei den BoDV-1-infizierten Mäusen

0: keine Entzündungszellinfiltration; 1: geringgradige Entzündungszellinfiltration; 2: mittelgradige Entzündungszellinfiltration; 3: hochgradige Entzündungszellinfiltration; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; p.i.: *post infectionem*; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*

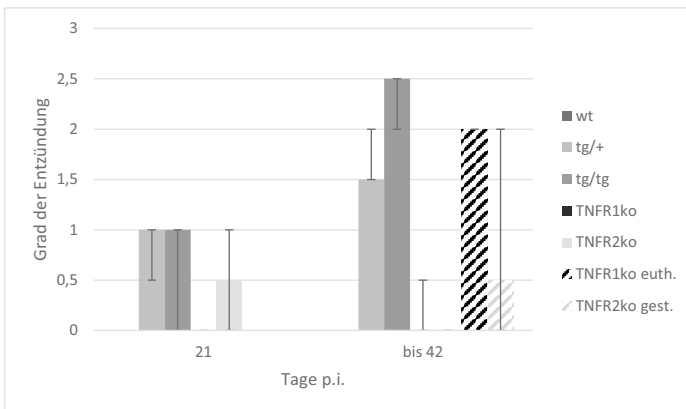


Abb. 16: Entzündliche Veränderungen bei den BoDV-1-infizierten Mäusen mit separater Betrachtung der euthanasierten BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Maus und der gestorbenen BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse (schraffiert)

0: keine Entzündungszellinfiltration; 1: geringgradige Entzündungszellinfiltration; 2: mittelgradige Entzündungszellinfiltration; 3: hochgradige Entzündungszellinfiltration; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; p.i.: *post infectionem*; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; euth.: euthanasiert; gest.: gestorben

Tabelle 13: Dreifaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm, BoDV-1-Infektion und Alter/Dauer der Infektion auf die entzündlichen Veränderungen

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach- wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach- wechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	BoDV-1	Alter/DI	Stamm + BoDV-1	Stamm + Alter/DI	BoDV-1 + Alter/DI	Stamm + BoDV-1 + Alter/DI
< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	0,0001

p-Wert: *probability*; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; DI: Dauer der Infektion; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede

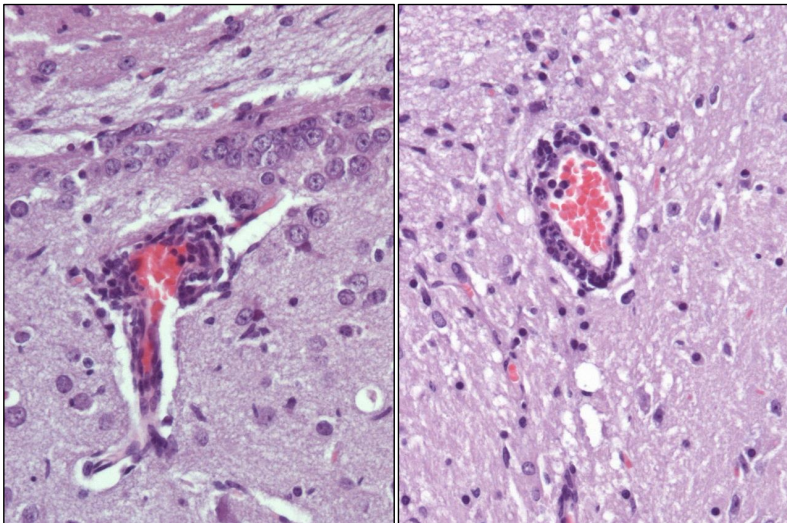


Abb. 17: Mononukleäre perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate

Mittelgradige mononukleäre/lymphoplasmazelluläre perivaskuläre Infiltrate im Striatum bei BoDV-1-infizierter und 29 dpi euthanasierter TNFR1ko-Maus (links) sowie im Thalamus bei BoDV-1-infizierter und 30 dpi an generalisiertem epileptiformem Krampfanfall gestorbener TNFR2ko-Maus (rechts).

Gesamtvergrößerung: 200x

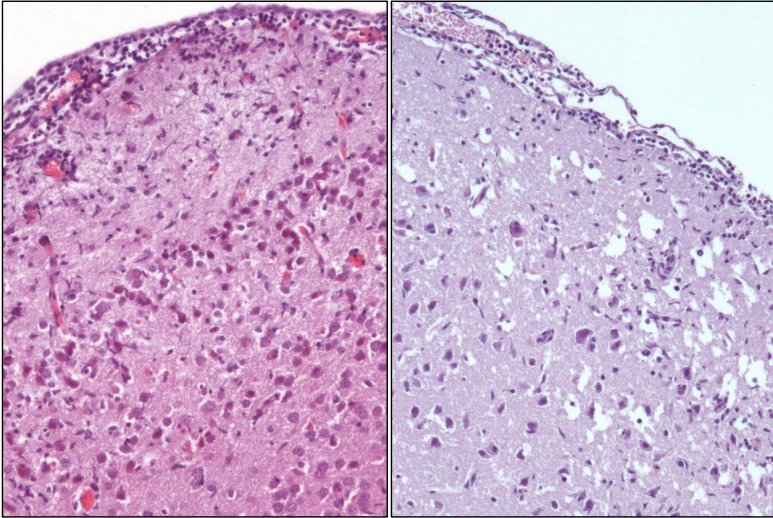


Abb. 18: Mononukleäre Meningitis

Mononukleäre/lymphoplasmazelluläre Meningitis bei BoDV-1-infizierter und 29 dpi euthanasierter TNFR1ko-Maus (links) sowie bei BoDV-1-infizierter und 30 dpi an generalisiertem eplileptiformem Krampfanfall gestorbener TNFR2ko-Maus (rechts). Gesamtvergrößerung: 100x

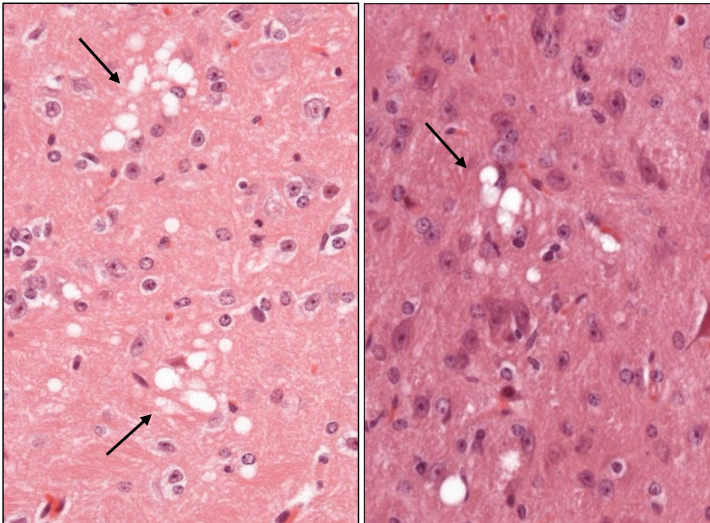


Abb. 19: Vakuolisierung

Vakuolisierung (Pfeile) im Thalamus bei BoDV-1-infizierter TNF-tg/tg-Maus 42 dpi (links) sowie im Rhombencephalon bei BoDV-1-infizierter und 29 dpi euthanasierter TNFR1ko-Maus (rechts).

Gesamtvergrößerung: 200x

4.1.2.2. Astrozytenaktivierung

Lediglich die Mock- und BoDV-1-infizierten Gruppen wurden in der H&E-Färbung hinsichtlich des Auftretens von aktivierten Astrozyten untersucht (siehe auch 3.1.4.2. und Anhang 8.3.2.). Aktivierte Astrozyten waren hypertroph und zeigten morphologisch häufig einen deutlich vergrößerten Zellkern (ca. 7 - 12 µm im Durchmesser) mit grobscholligem Chromatin und z.T. mit Kernwandhyperchromasie im Vergleich zu nicht aktivierten Astrozyten (ca. 5,5 – 6,5 µm im Durchmesser). Die astrozytären Veränderungen fanden sich in den gleichen Gehirnregionen wie die entsprechenden entzündlichen Veränderungen der jeweiligen Tiere der verschiedenen Gruppen, da sie immer in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate auftraten (siehe auch 4.1.2.1.).

Aus der **Mock-infizierten** Gruppe zeigten keine Mäuse zu den Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 dpi eine Astrozytenaktivierung (siehe Anhang 8.3.2.).

In der **BoDV-1-infizierten** Gruppe (Abb. 20-21) zeigten die **wt-Mäuse** zu keinem Zeitpunkt eine Astrozytenaktivierung.

Dagegen zeigten die **BoDV-1-infizierten TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäuse** 21 dpi eine geringgradige Astrozytenaktivierung mit vereinzelt aktivierten Astrozyten in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate im Cortex cerebri und zum Teil auch im Striatum oder Thalamus (siehe auch 4.1.2.1.), deren Anzahl 42 dpi deutlich zunahm und welche bei drei TNF-tg/+ Mäusen zum Teil degeneriert erscheinende, vergrößerte Zellkerne aufwiesen, was einer mittelgradigen Astrozytenaktivierung entsprach. Die degeneriert erscheinenden, vergrößerten Zellkerne der aktivierten Astrozyten stellten sich teils mit Kernwandhyperchromasie (Abb. 22, rechts) und teils mit fragmentiert erscheinenden Zellkernen dar (Abb. 22, links). Bei den TNF-tg/tg-Mäusen zeigten die Astrozyten von allen fünf Tieren 42 dpi zum Teil bzw. in einem Fall auch häufig degeneriert erscheinende, vergrößerte Zellkerne (Abb. 22) in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate im Cortex cerebri, Striatum und Thalamus, was einer mittelgradigen bzw. hochgradigen Astrozytenaktivierung entsprach.

Keine der **BoDV-1-infizierten TNFR1ko- oder TNFR2ko-Mäuse** wies eine Astrozytenaktivierung auf, mit Ausnahme der mit 29 dpi aufgrund von klinischen Auffälligkeiten (siehe auch 4.1.1.) euthanasierten TNFR1ko-Maus (MR-R1-Nr. 32-V316/14), welche zahlreiche aktivierte Astrozyten mit zum Teil degeneriert erscheinenden, vergrößerten Zellkernen in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate vor allem im Cortex cerebri, Thalamus und Ammonshorn zeigte (siehe auch 4.1.2.1.), was einer mittelgradigen Astrozytenaktivierung entsprach (Abb. 21; Abb. 23, links). Ebenfalls zeigte die 30 dpi an einem generalisierten epileptiformen Krampfanfall gestorbene TNFR2ko-Maus (MR-R2-Nr. 33-V67/14) zahlreiche aktivierte Astrozyten mit relativ häufig degeneriert erscheinenden, vergrößerten Zellkernen in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate v.a. im Cortex cerebri und Thalamus (siehe auch 4.1.2.1.), was einer mittel- bis hochgradigen Astrozytenaktivierung entsprach (Abb. 21; Abb. 23, rechts).

Insgesamt fanden sich bezüglich der Astrozytenaktivierung in der Gruppe der BoDV-1-infizierten Tiere zwischen den Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko) sowie zwischen den beiden Altersgruppen 21 und 42 Tage bzw. zwischen der Infektionsdauer 21 und 42 dpi statistisch hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$; siehe Tabelle 14). So zeigten in der Gruppe der BoDV-1-infizierten Tiere, die TNF-transgenen Mäuse eine hochsignifikant stärkere Astrozytenaktivierung als die wt-Mäuse, welche keine Astrozytenaktivierung zeigten. Außerdem zeigten insgesamt die 42 Tage alten Mäuse eine hochsignifikant deutlichere Astrozytenaktivierung als die 21 Tage alten Mäuse. Die Astrozytenaktivierung nahm also sowohl mit der Dauer der Infektion (42 dpi > 21 dpi) als auch mit der Veränderung des TNF-Systems zu (TNF-tg/tg > TNF-tg/+ > wt sowie TNFR1ko und TNFR2ko > wt). Weiterhin lag eine statistisch signifikante Zweifachwechselwirkung ($p =$

0,0083) bezüglich Mausstamm und Alter bzw. Infektionsdauer der Tiere in der Gruppe der BoDV-1-infizierten Mäuse vor (siehe Tabelle 14). Danach zeigten die TNF-transgenen Mäuse 42 dpi eine signifikant deutlichere Astrozytenaktivierung als die wt-Mäuse 42 dpi bzw. als die TNF-transgenen Mäuse 21 dpi. Innerhalb der BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäuse nahm die Astrozytenaktivierung also mit der Infektionsdauer zu, hingegen war innerhalb der BoDV-1-infizierten wt-Mäuse unabhängig von der Dauer der Infektion keine Astrozytenaktivierung festzustellen (Abb. 20).

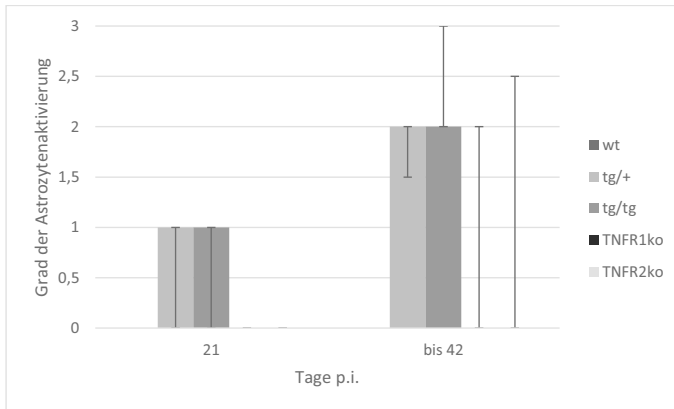


Abb. 20: Astrozytenaktivierung bei den BoDV-1-infizierten Mäusen

0: keine Astrozytenaktivierung; 1: geringgradige Astrozytenaktivierung; 2: mittelgradige Astrozytenaktivierung; 3: hochgradige Astrozytenaktivierung; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; p.i.: *post infectionem*; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*

ERGEBNISSE

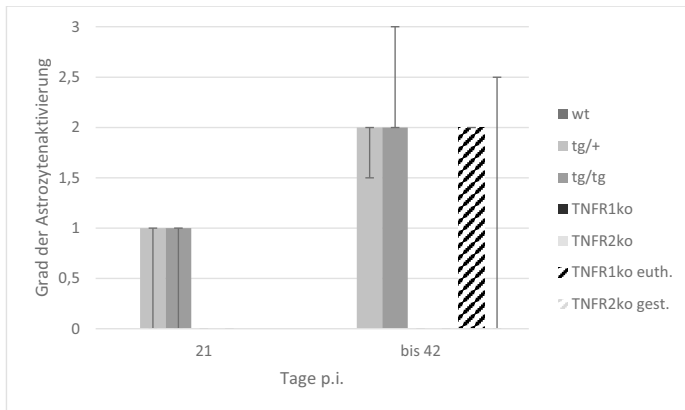


Abb. 21: Astrozytenaktivierung bei den BoDV-1-infizierten Mäusen mit separater Betrachtung der euthanasierten TNFR1ko-Maus und der gestorbenen TNFR2ko-Mäuse (schraffiert)

0: keine Astrozytenaktivierung; 1: geringgradige Astrozytenaktivierung; 2: mittelgradige Astrozytenaktivierung; 3: hochgradige Astrozytenaktivierung; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; p.i.: *post infectionem*; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; euth.: euthanasiert; gest.: gestorben

Tabelle 14: Zweifaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm und Alter/Dauer der Infektion auf die Astrozytenaktivierung bei den BoDV-1-infizierten Mäusen

Haupteffekte (p-Wert)		Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	Alter/DI	Stamm + Alter/DI
< 0,0001	< 0,0001	0,0083

p-Wert: *probability*; DI: Dauer der Infektion; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede

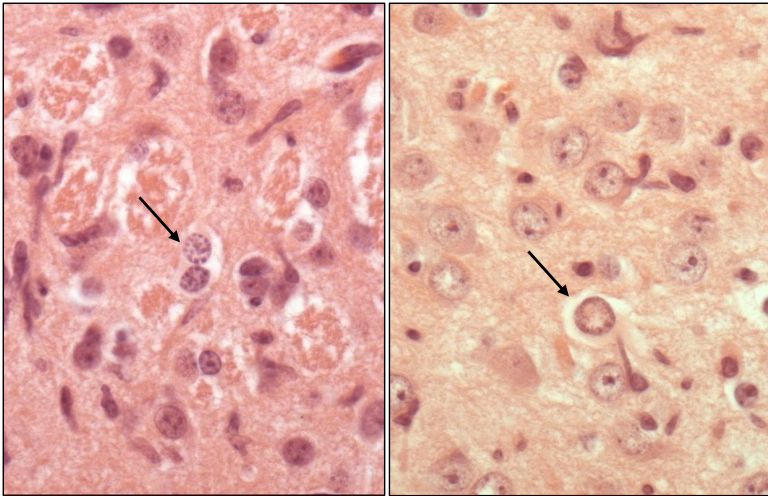


Abb. 22: Hypertrophe aktivierte Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen

Hypertrophe aktivierte Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen (Pfeile) im Striatum bei BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen 42 dpi; teils mit fragmentiert erscheinendem Zellkern (links) und teils mit Kernwandhyperchromasie (rechts).

Gesamtvergrößerung: 400x

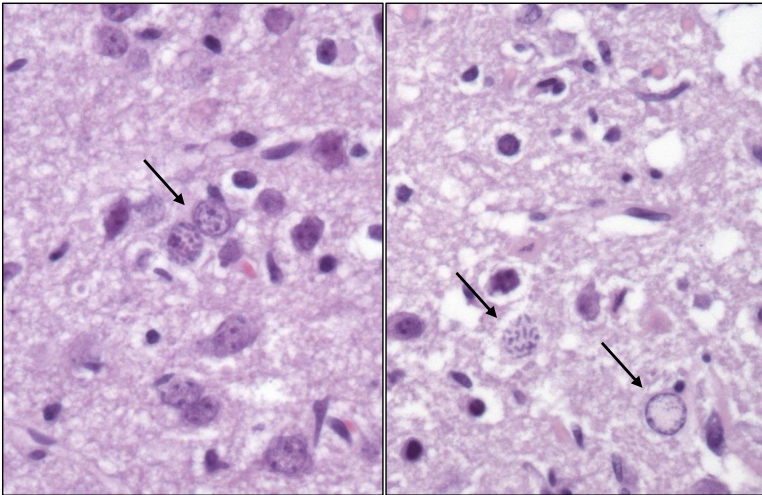


Abb. 23: Hypertrophe aktivierte Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen
Hypertrophe aktivierte Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen (Pfeile) im Cortex cerebri bei BoDV-1-infizierter und 29 dpi euthanasierter TNFR1ko-Maus (links) sowie bei BoDV-1-infizierter und 30 dpi an generalisiertem epileptiformem Krampfanfall gestorbener TNFR2ko-Maus (rechts); teils mit fragmentiert erscheinendem Zellkern (links und rechts) und teils mit Kernwandhyperchromasie (rechts).
Gesamtvergrößerung: 400x

4.1.3. Immunhistologische Nachweise von BoDV-N, GFAP, GLT1, GLAST, aktivierter Caspase 3 und AIF

Die BoDV-1-Infektion wurde in den Mäusegehirnen durch den Nachweis von BoDV-N bestätigt. Außerdem erfolgte eine immunhistologische Untersuchung zur Detektion des Astrozytenmarkers GFAP, der Glutamattransportermarker GLT1 und GLAST sowie von aktivierter Caspase 3 zum Nachweis von Apoptose und intranukleärem AIF zum Nachweis des Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods (siehe auch Tabelle 8, 3.1.5.).

4.1.3.1. Nachweis des BoDV-1-Nukleoproteins (BoDV-N)

Die immunhistologische Untersuchung zum Nachweis von BoDV-N erfolgte bei allen BoDV-1-infizierten Mäusen (Abb. 24) sowie bei den Mock-infizierten Mäusen zur Bestätigung, dass keine BoDV-1-Infektion vorlag (siehe auch 3.1.5.3. und Anhang 8.3.3.). Bei den nicht infizierten Mäusen wurde auf diese Untersuchung verzichtet, da eine akzidentielle BoDV-1-Infektion durch zeitliche und räumliche Trennung zur BoDV-1-infizierten Gruppe ausgeschlossen werden konnte.

In der Gruppe der **Mock-infizierten Mäuse** (siehe Anhang 8.3.3.) wurde bei keinem Tier BoDV-N nachgewiesen.

In der Gruppe der **BoDV-1-infizierten Tiere** ließ sich BoDV-N bei allen Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko) in Zytoplasma und Zellkernen von Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und vereinzelt Ependymzellen sowie multifokal im Neuropil nachweisen (Abb. 25 – 30). In Mikroglia konnte kein BoDV-N nachgewiesen werden. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 dpi waren die BoDV-N-positiven Zellen zufällig über die Gehirnregionen verteilt mit Ausnahme der Cornu ammonis 1 (CA1)-Region, in welcher die Mehrzahl der Neurone BoDV-N-negativ waren. Es war kein Unterschied zwischen den entzündlich veränderten und unveränderten Arealen bezüglich des BoDV-N-Nachweises bei allen Mausstämmen zu sehen. Grundsätzlich war bei allen BoDV-1-infizierten Mausstämmen bereits 21 dpi ein mittel- bis hochgradiger BoDV-N-Nachweis in allen Gehirnregionen möglich (Abb. 25 und Abb. 26, oben). Bis auf wenige Ausnahmen zeigte sich 42 dpi bei allen Mausstämmen ein hochgradiger BoDV-N-Nachweis in allen Gehirnregionen (Abb. 26, unten).

Das 29 dpi euthanasierte TNFR1ko-Tier (MR-R1-Nr. 32-V316/14), sowie die 30 und 40 dpi gestorbenen TNFR2ko-Tiere (MR-R2-Nr. 33-V67/14 und MR-R2-Nr. 48-V306/14; siehe 4.1.1.) zeigten einen mittel- bis hochgradigen BoDV-N-Nachweis in allen Gehirnregionen. Das 37 dpi gestorbene TNFR2ko-Tier (MR-R2-Nr. 30-V63/14; siehe 4.1.1.) zeigte einen mittelgradigen BoDV-N-Nachweis in allen Gehirnregionen.

Insgesamt fanden sich bezüglich des BoDV-N-Nachweises in der Gruppe der BoDV-1-infizierten Mäuse nur zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 dpi statistisch signifikante Unterschiede ($p = 0,016$, siehe Tabelle 15), nicht jedoch zwischen den einzelnen Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko). So konnten bei den Mäusen 42 dpi, unabhängig vom Mausstamm, signifikant mehr BoDV-N-positiv Zellen im Gehirn nachgewiesen werden, als bei den Mäusen 21 dpi. Es kam also zu einer signifikanten Zunahme an BoDV-N-positiven Zellen im Gehirn mit der Infektionsdauer (42 dpi > 21 dpi). Demnach fand sich unter den BoDV-1-infizierten Mäusen keine statistisch signifikante Zweifachwechselwirkung bezüglich Mausstamm und Dauer der Infektion (siehe Tabelle 15). Der Status des TNF-Systems der Mäuse hat also keinen Einfluss auf die BoDV-1-Infektion.

ERGEBNISSE

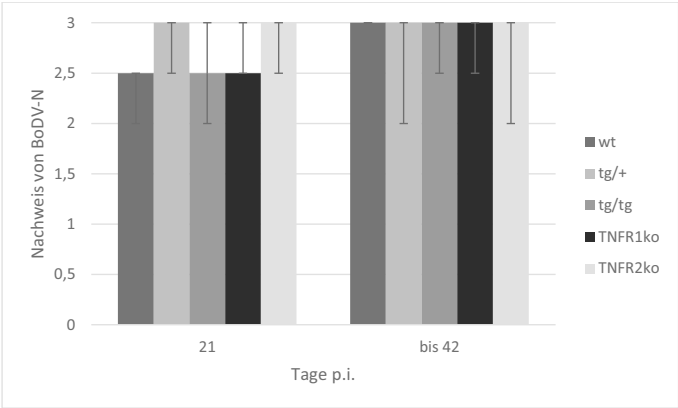


Abb. 24: BoDV-N-Nachweis bei den BoDV-1-infizierten Mäusen
0: kein BoDV-N-Nachweis; 1: geringgradiger BoDV-N-Nachweis; 2: mittelgradiger BoDV-N-Nachweis; 3: hochgradiger BoDV-N-Nachweis; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; BoDV-N: *Borna disease virus* 1 Nukleoprotein; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; p.i.: *post infectionem*; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*

Tabelle 15: Zweifaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm und Alter/Dauer der Infektion auf den BoDV-N-Nachweis bei den BoDV-1-infizierten Mäusen

Haupteffekte (p-Wert)		Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	Alter/DI	Stamm + Alter/DI
0,73	0,016	0,064

p-Wert: *probability*; DI: Dauer der Infektion; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede



Abb. 25: Nachweis von BoDV-N im Ammonshorn und Cortex cerebri

BoDV-N-Nachweis disseminiert im Cortex cerebri und Ammonshorn, mit Ausnahme der CA1-Region, bei BoDV-1-infizierter TNF-tg/tg-Maus 21 dpi.

Gesamtvergrößerung: 20x

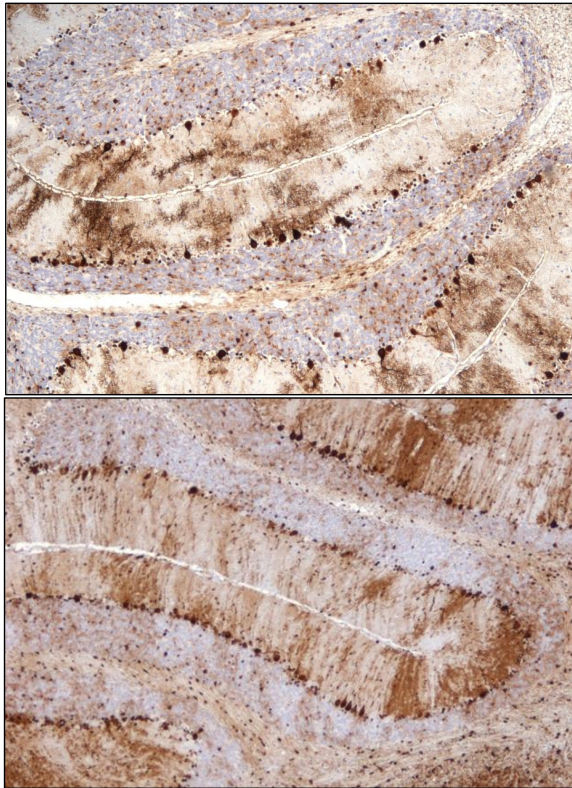


Abb. 26: Nachweis von BoDV-N im Kleinhirn

BoDV-N-Nachweis im Kleinhirn bei BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäusen 21 dpi (oben) und 42 dpi (unten).

Gesamtvergrößerung: 40x

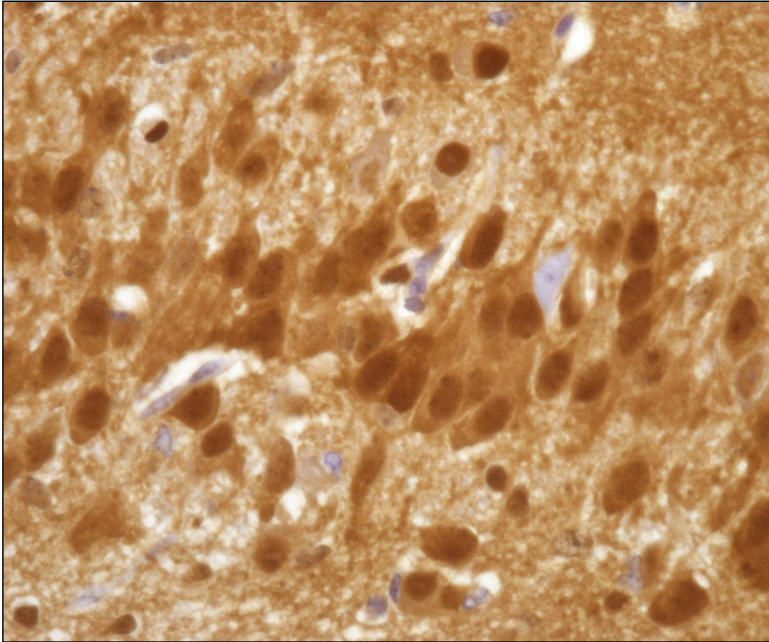


Abb. 27: Nachweis von BoDV-N in Neuronen des Stratum granulare des Hippocampus
BoDV-N-Nachweis in Neuronen des Stratum granulare des Hippocampus bei BoDV-1-
infizierter TNF-tg/tg-Maus 21 dpi.
Gesamtvergrößerung: 400x

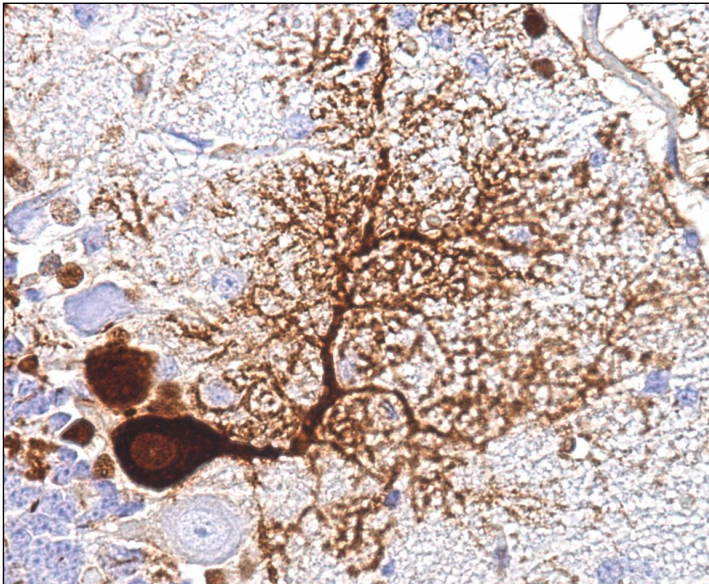


Abb. 28: Nachweis von BoDV-N in Purkinjezelle des Kleinhirns

BoDV-N-Nachweis in Purkinjezelle des Kleinhirns bei BoDV-1-infizierter TNFR1ko-Maus 21 dpi.

Gesamtvergrößerung: 400x

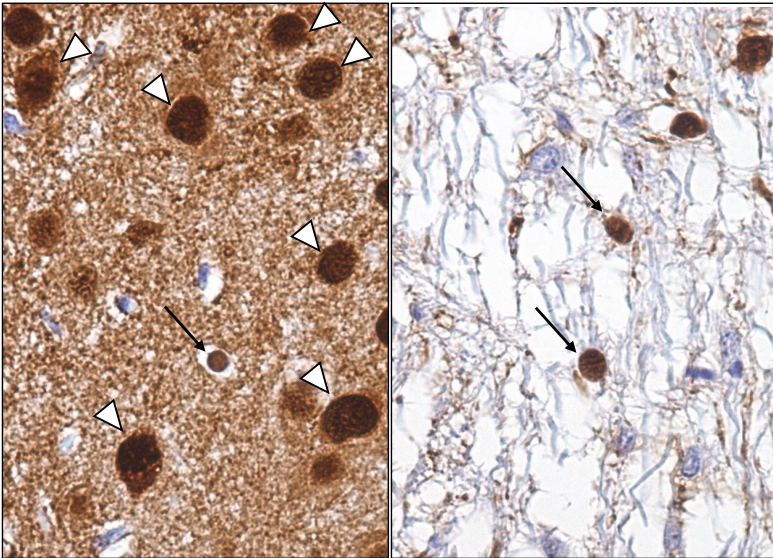


Abb. 29: Nachweis von BoDV-N in verschiedenen Gehirnzellen

BoDV-N-Nachweis in Neuronen (links, Pfeilspitzen), Astrozyten (links, Pfeil) und Oligodendrozyten (rechts, Pfeile) mit zum Teil ausgeprägter Neuropilreaktion (links) bei BoDV-1-infizierter TNFR1ko-Maus 21 dpi.

Gesamtvergrößerung: 400x

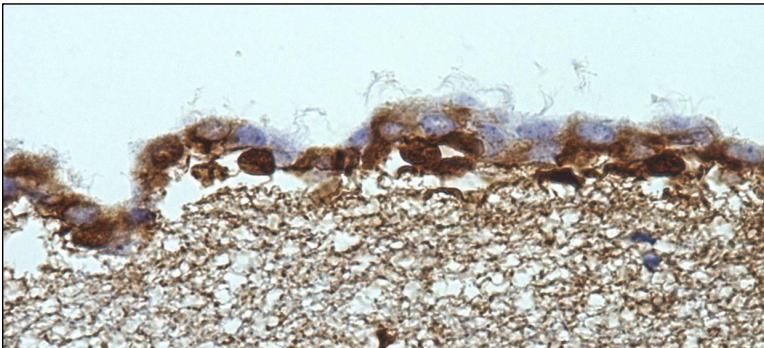


Abb. 30: Nachweis von BoDV-N in Ependymzellen

BoDV-N-Nachweis in Ependymzellen bei BoDV-1-infizierter TNFR1ko-Maus 21 dpi.

Gesamtvergrößerung: 400x

4.1.3.2. Nachweis des *glial fibrillary acidic proteins* (GFAP)

Alle Mäuse wurden immunhistologisch hinsichtlich der Anzahl und des Aussehens GFAP-positiver Astrozyten untersucht (Abb. 31; siehe auch 3.1.5.3. und Anhang 8.3.4.). Die GFAP-

positiven Astrozyten zeigten zum Teil deutlich vergrößerte Zellkerne (ca. 7 – 12 µm im Durchmesser, siehe auch 4.1.2.2.).

Aus der **Mock-infizierten** Gruppe zeigten sämtliche Mäuse aller Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko) zu den Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 dpi durchschnittlich < 30 GFAP-positive Astrozyten pro HPF, ohne deutlich vergrößerte Zellkerne, in allen Gehirnregionen (siehe Anhang 8.3.4.).

In der **nicht infizierten** Gruppe aus allen Mausstämmen (Abb. 31, blau) traf dies bis auf ein einzelnes TNF-tg/+Tier 42 dpi, ein einzelnes TNF-tg/tg-Tier 21 dpi sowie zwei TNF-tg/tg-Tiere 42 dpi, welche etwas mehr als 30 GFAP-positive Astrozyten pro HPF zeigten, ebenfalls zu.

In der Gruppe der **BoDV-1-infizierten** Tiere aus allen Mausstämmen (Abb. 31, grün) zeigten alle **wt-Mäuse** zu beiden Zeitpunkten 21 und 42 dpi durchschnittlich < 30 GFAP-positive Astrozyten pro HPF, ohne deutlich vergrößerte Zellkerne (Abb. 32, links).

Bei den **BoDV-1-infizierten TNF-tg/+Mäusen** zeigten vier Tiere, bei den **TNF-tg/tg-Mäusen** drei Tiere 21 dpi ebenfalls < 30 GFAP-positive Astrozyten pro HPF, ohne deutlich vergrößerte Zellkerne. Lediglich ein TNF-tg/+ bzw. zwei TNF-tg/tg-Tiere zeigten 21 dpi 30 – 60 GFAP-positive Astrozyten pro HPF, welche jedoch ebenfalls keine deutlich vergrößerten Zellkerne aufwiesen. Mit 42 dpi fanden sich jeweils drei TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Tiere (Abb. 32, rechts) mit 30 – 60 GFAP-positiven Astrozyten pro HPF, ohne deutlich vergrößerte Zellkerne und jeweils zwei TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Tiere, welche zusätzlich einige deutlich vergrößerte Astrozytenzellkerne aufwiesen (ca. 10 – 12 µm).

Bei den **BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäusen** zeigten alle, bei den **TNFR1ko-Mäusen** alle bis auf ein Tier bereits 21 dpi 30 – 60 GFAP-positive Astrozyten pro HPF, ohne deutlich vergrößerte Zellkerne, wobei das eine TNFR1ko-Tier zusätzlich einige deutlich vergrößerte Astrozytenzellkerne aufwies.

Mit 42 dpi zeigten sowohl die TNFR1ko- als auch die TNFR2ko-Mäuse aus der BoDV-1-infizierten Gruppe durchschnittlich 30 – 60 GFAP-positive Astrozyten pro HPF mit einigen deutlich vergrößerten Zellkernen, wobei jeweils ein Tier in manchen HPFs > 60 GFAP-positive Astrozyten aufwies.

Auch das 29 dpi aufgrund von klinischen Auffälligkeiten (siehe 4.1.1.) euthanasierte BoDV-1-infizierte TNFR1ko-Tier (MR-R1-Nr. 32-V316/14) zeigte in manchen HPFs > 60 GFAP-positive Astrozyten mit einigen deutlich vergrößerten Zellkernen (Abb. 33, links).

Das an einem generalisierten epileptiformen Krampfanfall 30 dpi gestorbene BoDV-1-infizierte TNFR2ko-Tier (MR-R2-Nr. 33-V67/14; Abb. 33, rechts) sowie das 37 dpi nach Verhaltensauffälligkeiten mit gestreckten Hintergliedmaßen tot aufgefundene TNFR2ko-Tier (MR-R2-Nr. 30-V63/14; siehe 4.1.1.) zeigten jeweils 30 – 60 GFAP-positive Astrozyten pro HPF mit einzelnen deutlich vergrößerten Zellkernen. Das 40 dpi mit struppigem Fell, gekrümmtem Rücken und gestreckten Hintergliedmaßen tot aufgefundene TNFR2ko-Tier (MR-R2-Nr. 48-V306/14) zeigte überwiegend 30 – 60 GFAP-positive Astrozyten pro HPF, ohne deutlich vergrößerte Zellkerne.

Unabhängig vom jeweiligen Mausstamm waren die meisten vergrößerten Astrozytenzellkerne, sofern vergrößerte Zellkerne nachgewiesen werden konnten, unmittelbar in der Umgebung der stärksten Entzündungszellinfiltrate zu finden, welche vor allem im Cortex cerebri, Striatum und Thalamus zu finden waren.

Insgesamt fanden sich bezüglich der GFAP-positiven Astrozyten zwischen den Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko), den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen sowie zwischen den beiden Altersgruppen 21 und 42 Tage bzw. Infektionsgruppen 21 und 42 dpi statistisch hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$, siehe Tabelle 16). So zeigten insgesamt die TNF-transgenen sowie die TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse hochsignifikant mehr GFAP-positive Zellen als die wt-Mäuse, die 42 Tage alten Tiere aller Mausstämmen zeigten insgesamt betrachtet hochsignifikant mehr GFAP-positive Zellen als die 21 Tage alten Tiere aller Mausstämmen und die BoDV-1-infizierten Mäuse aller Mausstämmen zeigten insgesamt betrachtet hochsignifikant mehr GFAP-positive Zellen als die nicht infizierten Mäuse aller Mausstämmen (Abb. 31). Insgesamt nahmen also die Anzahl GFAP-positiver Zellen sowie das Auftreten von GFAP-positiven Zellen mit deutlich vergrößerten Zellkernen mit der Infektion (BoDV-1-infiziert > nicht infiziert), dem Alter bzw. der Dauer der Infektion (42 Tage/dpi > 21 Tage/dpi) und der Veränderung des TNF-Systems zu (TNF-tg/tg > TNF-tg/+ > wt sowie TNFR1ko und TNFR2ko > wt, TNF-tg/+ und TNF-tg/tg). Außerdem lagen statistisch hochsignifikante Zweifachwechselwirkungen ($p \leq 0,0001$) bezüglich Mausstamm und BoDV-1-Infektion sowie Altersgruppe bzw. Infektionsdauer und BoDV-1-Infektion und statistisch signifikante Zweifachwechselwirkungen ($p = 0,031$) bezüglich Mausstamm und Alter bzw. Infektionsdauer vor (siehe Tabelle 16). So gab es keinen Unterschied zwischen den BoDV-1-infizierten wt-Mäusen und den nicht infizierten wt-Mäusen, hingegen zeigten die BoDV-1-infizierten Mäuse mit verändertem TNF-System (TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko und TNFR2ko) hochsignifikant mehr GFAP-positive Zellen als die nicht infizierten Mäuse mit verändertem TNF-System. Ebenfalls zeigten die BoDV-1-infizierten Mäuse 42 dpi insgesamt betrachtet hochsignifikant mehr GFAP-positive Zellen als 21 dpi,

jedoch lag innerhalb der nicht infizierten Mäuse keine signifikante Zunahme zwischen den 21 und 42 Tage alten Tieren vor, was für einen Einfluss der Infektionsdauer und nicht des Alters der Tiere spricht. Weiterhin zeigten innerhalb der Gruppe der transgenen Tiere (einschließlich der TNFR1ko- und TNFR2ko-Tiere) Mäuse 42 dpi signifikant mehr GFAP-positive Zellen als 21 dpi. Diese Zunahme der GFAP-positiven Zellen mit der Infektionsdauer innerhalb der Gruppe der Tiere mit verändertem TNF-System fand sich bei den wt-Tieren nicht (Abb. 31). Eine statistisch signifikante Dreifachwechselwirkung bezüglich Mausstamm, Infektionsstatus und Alter bzw. Infektionsdauer lag nicht vor (siehe Tabelle 16).

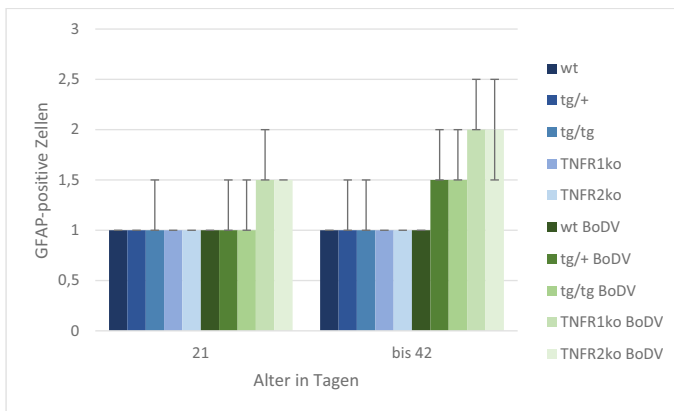


Abb. 31: GFAP-positive Astrozyten bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen
0: keine GFAP-positiven Zellen; 1: < 30 GFAP-positive Zellen/HPF; 2: 30 – 60 GFAP-positive Zellen/HPF, einige davon mit deutlich vergrößertem Zellkern; 3: > 60 GFAP-positive Zellen/HPF, einige davon mit deutlich vergrößertem Zellkern; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (grün); blau: nicht infiziert

Tabelle 16: Dreifaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm, BoDV-1-Infektion und Alter/Dauer der Infektion auf GFAP-positive Astrozyten

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach- wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach- wechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	BoDV-1	Alter/DI	Stamm + BoDV-1	Stamm + Alter/DI	BoDV-1 + Alter/DI	Stamm + BoDV-1 + Alter/DI
< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,031	< 0,0001	0,11

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; p-Wert: *probability*; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; DI: Dauer der Infektion; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede

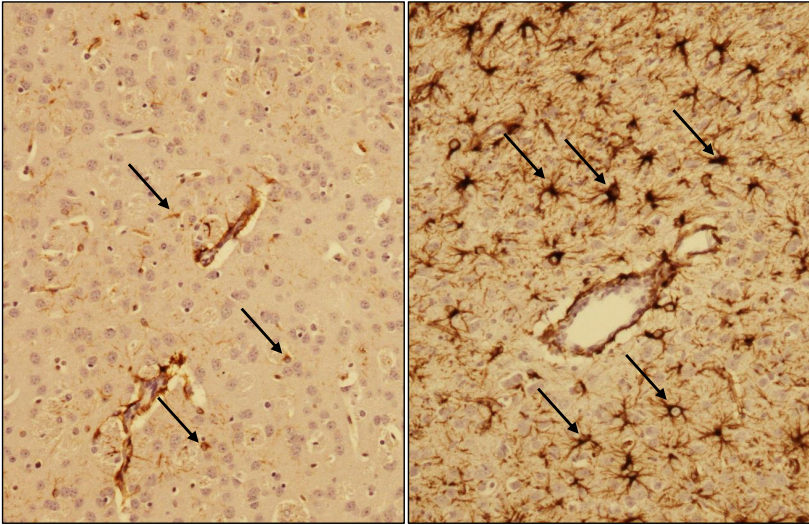


Abb. 32: Nachweis von GFAP-positiven Astrozyten im Striatum

GFAP-positive Astrozyten (Pfeile) im Striatum bei BoDV-1-infizierter wt-Maus 21 dpi (links; < 30 GFAP-positive Zellen/HPF) sowie bei BoDV-1-infizierter TNF-tg/tg-Maus 42 dpi (rechts; 30 – 60 GFAP-positive Zellen/HPF).

Gesamtvergrößerung: 100x

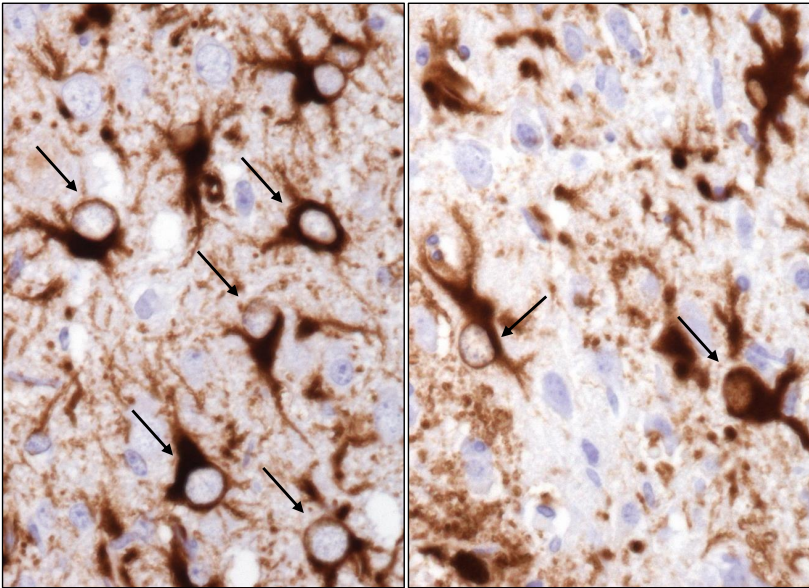


Abb. 33: Nachweis von GFAP-positiven aktivierten Astrozyten mit deutlich vergrößerten Zellkernen

Nachweis von GFAP-positiven aktivierten Astrozyten mit deutlich vergrößerten Zellkernen (Pfeile) bei BoDV-1-infizierter und 29 dpi euthanasierter TNFR1ko-Maus (links) sowie bei BoDV-1-infizierter und 30 dpi an generalisiertem eplileptiformem Krampfanfall gestorbener TNFR2ko-Maus (rechts).

Gesamtvergrößerung: 400x

4.1.3.3. Nachweis der Glutamattransporter

4.1.3.3.1. Nachweis des Glutamattransporters 1 (GLT1)

Die GLT1-Expression und -Verteilung wurde bei allen Mausgruppen (wt, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko), ausgenommen der TNF-tg/+-Mäuse, untersucht (Abb. 34; siehe auch 3.1.5.3. und Anhang 8.3.5.).

In der Gruppe der **nicht infizierten** Tiere (Abb. 34, blau) zeigten die **wt-Mäuse** mit 21 Tagen bei zwei von drei Tieren eine fleckig verteilte, geringgradige, granuläre Reaktion im Neuropil des Gehirns, vor allem im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon sowie im Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus (Abb. 35-36, links). Bei einem Tier war eine fleckig verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion in den gleichen Gehirnregionen zuzüglich des Stratum moleculare des Kleinhirns zu finden, sowie eine eher diffuse, mittelgradige, granuläre Reaktion im Hippocampus. Mit 42 Tagen kam es zu einer Expressionszunahme und alle untersuchten nicht infizierten wt-Tiere zeigten eine fleckig

verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon und Stratum moleculare des Kleinhirns sowie eine eher diffus verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion im Hippocampus.

Die **nicht infizierten TNF-tg/tg-Mäuse** zeigten in den oben genannten Gehirnregionen bereits 21 dpi eine mittelgradige, fleckig bis diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion, welche jedoch 42 dpi nicht zunahm, sondern es waren zu diesem Zeitpunkt unterschiedlich ausgeprägte GLT1-Expressionen, von fleckig verteilter, geringgradiger bis diffus verteilter, hochgradiger, granulärer Reaktion im Neuropil zu finden.

Die **nicht infizierten TNFR1ko-Mäuse** zeigten mit 21 Tagen überwiegend eine fleckig verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon und Stratum moleculare des Kleinhirns sowie eine relativ diffuse, mittelgradige, granuläre Reaktion im Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus. Ein Tier wies jedoch auch eine diffus verteilte, hochgradige Reaktion in allen genannten Gehirnregionen, exklusive des Stratum moleculare des Kleinhirns, wo eine eher fleckig verteilte Reaktion vorlag, auf. Mit 42 Tagen nahm die GLT1-Expression bei den nicht infizierten TNFR1ko-Mäusen zu und alle Tiere zeigten eine diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion in den oben genannten Gehirnregionen.

Die **nicht infizierten TNFR2ko-Mäuse** zeigten zu beiden Untersuchungszeitpunkten überwiegend eine fleckig verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion vor allem im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon und Stratum moleculare des Kleinhirns sowie eine eher diffus verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion im Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus.

In der Gruppe der **Mock-infizierten** Mäuse (siehe Anhang 8.3.5.) zeigten **alle Mausstämme** ein ähnliches Reaktionsmuster wie die jeweiligen BoDV-1-infizierten Mäuse (siehe unten). Lediglich bei den Mock-infizierten **TNFR1ko-Mäusen** war die Ausprägung der Reaktion zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt geringer, wobei aber ein Anstieg der Reaktion von 21 dpi zu 42 dpi erhalten blieb. Dieser Anstieg war bei den Mock-infizierten TNFR1ko-Mäusen jedoch von geringgradiger GLT1-Expression 21 dpi zu mittelgradiger GLT1-Expression 42 dpi und nicht von mittelgradiger GLT1-Expression 21 dpi zu hochgradiger GLT1-Expression 42 dpi wie bei den BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäusen.

In der Gruppe der **BoDV-1-infizierten** Tiere (Abb. 34, grün) zeigten die **wt-Mäuse** 21 dpi eine jeweils unterschiedlich ausgeprägte GLT1-Expression, von fleckig verteilter, geringgradiger

bis zu diffus verteilter, hochgradiger, granulärer Reaktion im Neuropil des Gehirns. Mit 42 dpi kam es zu einer Expressionszunahme und alle BoDV-1-infizierten wt-Mäuse zeigten eine diffus verteilte, hochgradige, granuläre GLT1-Reaktion vor allem im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombenephalon und im Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus sowie eine eher fleckig verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion im Stratum moleculare des Kleinhirns (Abb. 35-36, rechts).

Die **BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäuse** zeigten bereits 21 dpi eine gleichartig ausgeprägte GLT1-Expression in den gleichen Gehirnregionen wie die nicht infizierten TNF-tg/tg-Mäuse, welche in diesem Fall 42 dpi noch geringgradig zunahm, sodass alle untersuchten BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Tiere 42 dpi eine diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon und Stratum moleculare und subgranulare des Hippocampus sowie eine eher fleckig verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion im Stratum moleculare des Kleinhirns aufwiesen.

Bei den **BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäusen** war die GLT1-Expression ähnlich wie bei den nicht infizierten TNFR1ko-Mäusen (siehe oben) und es war eine Zunahme der GLT1-Expression von 21 dpi mit überwiegend mittelgradiger GLT1-Expression, zu 42 dpi mit überwiegend hochgradiger GLT1-Expression zu erkennen.

Die **BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse** waren vergleichbar mit den nicht infizierten TNFR2ko-Mäusen (siehe oben) und zeigten zu beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 dpi eine überwiegend mittelgradige GLT1-Expression.

Das 29 dpi wegen klinischen Auffälligkeiten euthanasierte TNFR1ko-Tier (MR-R1-Nr. 32-V316/14) sowie das 40 dpi mit struppigem Fell, gekrümmtem Rücken und gestreckten Hintergliedmaßen tot aufgefundene TNFR2ko-Tier (MR-R2-Nr. 48-V306/14; siehe 4.1.1.) zeigten beide eine fleckig verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion vergleichbar mit den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäusen, wohingegen die 30 und 37 dpi gestorbenen TNFR2ko-Mäuse (MR-R2-Nr. 33-V67/14 und MR-R2-Nr. 30-V63/14; siehe 4.1.1.) nur eine fleckig verteilte, geringgradige, granuläre Reaktion aufwiesen, vergleichbar mit zwei von drei der nicht infizierten 21 Tage alten wt-Mäuse.

Bei allen Mäusen mit entzündlichen Veränderungen (zu welchen ausschließlich BoDV-1-infizierte Tiere gehörten) fiel, wie auch bei der GLAST-Expression (siehe 4.1.3.3.2.) auf, dass häufig in einem schmalen Saum um die mononukleären Entzündungszellinfiltrate nur ein sehr

dezent, granulärer GLT1-Nachweis zu sehen war, unabhängig von der Stärke der Reaktion bzw. Ausprägung der GLT1-Expression im restlichen Gewebe (Abb. 37).

Insgesamt fand sich bezüglich der GLT1-Expression nur zwischen den verschiedenen Mausstämmen (wt, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko) ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,017$; siehe Tabelle 17). So zeigten die TNF-transgenen Mäuse insgesamt eine signifikant stärker ausgeprägte GLT1-Expression als die wt-Mäuse, unabhängig vom Infektionsstatus (Abb. 34). Eine statistisch signifikante Zweifachwechselwirkung ($p = 0,017$) lag nur bezüglich Mausstamm und Altersgruppe bzw. Infektionsdauer vor (siehe Tabelle 17). So zeigten die 42 Tage alten wt-Mäuse unabhängig vom Infektionsstatus eine signifikant stärker ausgeprägte GLT1-Expression als die 21 Tage alten wt-Mäuse, was für eine altersabhängige Zunahme der GLT1-Expression (42 Tage > 21 Tage) und nicht für eine von der Infektionsdauer abhängige Zunahme der GLT1-Expression spricht. Hingegen kam es innerhalb mehrerer Mausgruppen mit verändertem TNF-System (z.B. bei den nicht infizierten TNF-tg/tg- und TNFR2ko-Mäusen) zu einer altersabhängigen Abnahme der GLT1-Expression (Abb. 34).

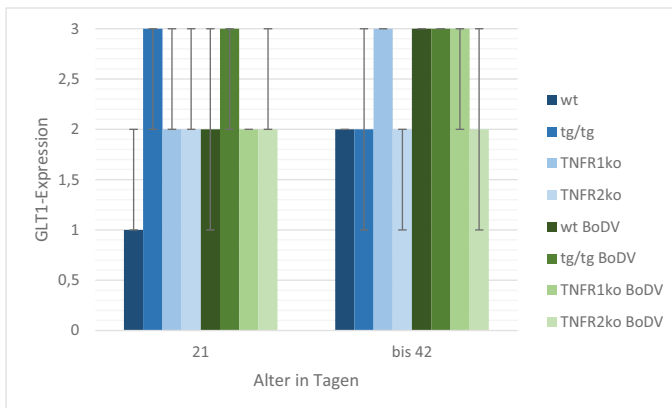


Abb. 34: Nachweis des Glutamattransporters 1 bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen

0: kein Nachweis; 1: geringgradige GLT1-Expression; 2: mittelgradige GLT1-Expression; 3: hochgradige GLT1-Expression; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; GLT1: Glutamattransporter 1; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; wt: Wildtyp; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (grün); blau: nicht infiziert

Tabelle 17: Dreifaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm, BoDV-1-Infektion und Alter/Dauer der Infektion auf die GLT1-Expression

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach- wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach- wechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	BoDV-1	Alter/DI	Stamm + BoDV-1	Stamm + Alter/DI	BoDV-1 + Alter/DI	Stamm + BoDV-1 + Alter/DI
0,017	0,14	0,14	0,067	0,017	0,14	0,78

GLT1: Glutamattransporter 1; p-Wert: *probability*; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; DI: Dauer der Infektion; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede

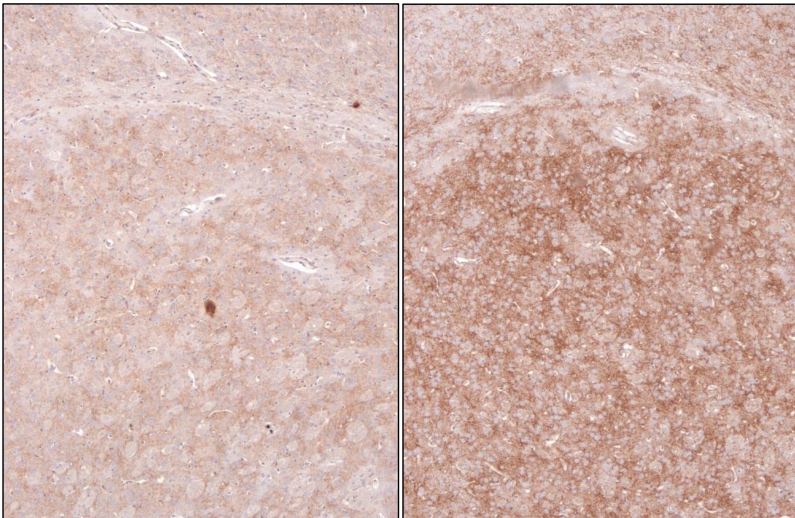


Abb. 35: Nachweis von GLT1 im Striatum

Nachweis von GLT1 im Striatum bei nicht infizierter und 21 Tage alter wt-Maus mit geringgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (links; *Score* 1) sowie bei BoDV-1-infizierter wt-Maus 42 dpi mit hochgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (rechts; *Score* 3) im Zytoplasma von Zellkörpern und Zellfortsätzen.

Gesamtvergrößerung: 40x

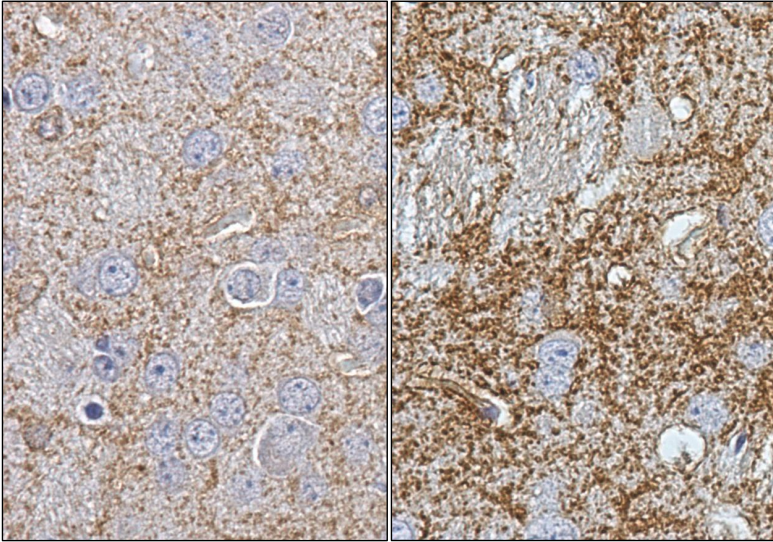


Abb. 36: Nachweis von GLT1 im Striatum

Nachweis von GLT1 im Striatum bei nicht infizierter und 21 Tage alter wt-Maus mit geringgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (links; *Score* 1) sowie bei BoDV-1-infizierter wt-Maus 42 dpi mit hochgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (rechts; *Score* 3) im Zytoplasma von Zellkörpern und Zellfortsätzen.
Gesamtvergrößerung: 400x

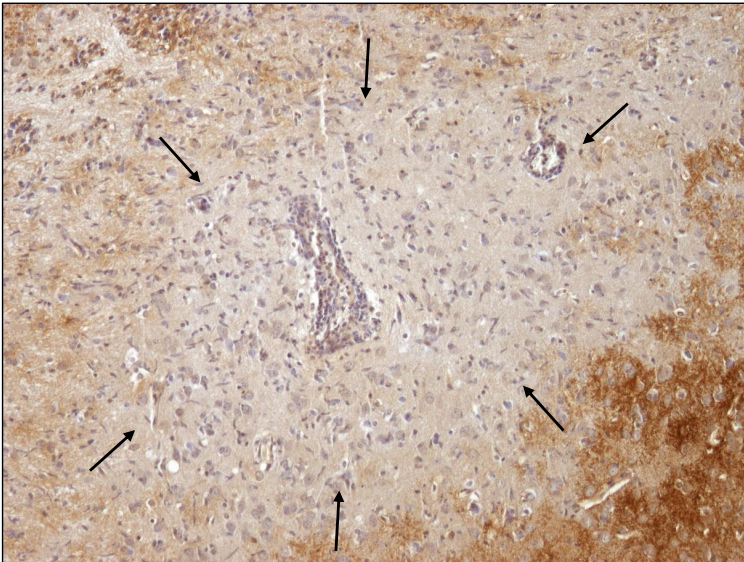


Abb. 37: Verminderter Nachweis von GLT1 um perivaskuläre mononukleäre Entzündungszellinfiltrate

Verminderter GLT1-Nachweis mit deutlich abgeschwächter, granulärer Reaktion um mononukleäre perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate (Pfeile) im Vergleich zur umgebenden hochgradigen, diffusen, granulären Reaktion (Score 3) bei BoDV-1-infizierter TNF-tg/tg-Maus 42 dpi im Striatum.

Gesamtvergrößerung: 100x

4.1.3.3.2. Nachweis des Glutamat-Aspartat-Transporters (GLAST)

Die GLAST-Expression und -Verteilung wurde bei allen Mausgruppen (wt, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko), ausgenommen der TNF-tg/+Mäuse, untersucht (Abb. 38; siehe auch 3.1.5.3. und Anhang 8.3.6.).

In der Gruppe der **nicht infizierten** Tiere (Abb. 38, blau) zeigten die **wt-Mäuse** mit 21 Tagen bei zwei von drei Tieren eine fleckig verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion im Neuropil des Gehirns, vor allem im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon und Stratum subgranulare des Hippocampus sowie eine mittelgradige, eher diffus verteilte Reaktion im Stratum molecule von Hippocampus und Kleinhirn. Bei einem Tier dieser Gruppe war die Expression lediglich geringgradig und fleckig verteilt im Cortex cerebri, Striatum und Rhombencephalon sowie geringgradig und relativ diffus verteilt im Stratum molecule von Hippocampus und Kleinhirn (Abb. 39, oben; Abb. 40, links). Mit 42 Tagen kam es bei den nicht infizierten wt-Mäusen zu einer Zunahme der GLAST-Expression, wobei zwei von drei Tieren eine hauptsächlich diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion in Cortex cerebri,

Striatum, Thalamus, Rhombencephalon, Stratum subgranulare und moleculare des Hippocampus und Stratum moleculare des Kleinhirns aufwiesen und ein Tier eine hauptsächlich fleckig verteilte, mittelgradige, granuläre Reaktion in den genannten Gehirnarealen zeigte.

Die **nicht infizierten TNF-tg/tg-Mäuse** zeigten zu beiden Zeitpunkten mit 21 und 42 Tagen eine gleichartige überwiegend diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion im Neuropil des Gehirns, vor allem im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon, Stratum subgranulare und moleculare des Hippocampus und Stratum moleculare des Kleinhirns.

Die **nicht infizierten TNFR1ko-Mäuse und TNFR2ko-Mäuse** zeigten zu beiden Zeitpunkten mit 21 und 42 Tagen eine ähnliche GLAST-Expression wie die 21 Tage alten BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäuse (siehe unten) mit überwiegend fleckig verteilter, mittelgradiger, granulärer Reaktion, wobei jedoch jeweils ein 42 Tage altes nicht infiziertes TNFR1ko- und TNFR2ko-Tier auch eine überwiegend diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion aufwies.

In der Gruppe der **Mock-infizierten** Tiere (siehe Anhang 8.3.6.) zeigten die **wt-Mäuse** eine ähnliche Reaktion wie die nicht infizierten Tiere des gleichen Alters, wohingegen bei den **TNF-tg/tg-Mäusen** die Mock-infizierten Tiere untereinander stark unterschiedlich ausgeprägte Reaktionen von geringgradiger bis hochgradiger GLAST-Expression aufwiesen, sodass sie mit keiner anderen Gruppe vergleichbar waren.

Bei den **TNFR1ko-Mäusen** zeigten die Mock-infizierten Tiere zu beiden Zeitpunkten 21 und 42 dpi eine mittelgradige GLAST-Expression, vergleichbar mit den jeweiligen nicht infizierten und BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Tieren (siehe oben bzw. unten).

Bei den **TNFR2ko-Mäusen** zeigten die Mock-infizierten Tiere eine fleckig bis diffus verteilte, überwiegend hochgradige Reaktion im Neuropil zu beiden Zeitpunkten 21 und 42 dpi und damit eine stärker ausgeprägte GLAST-Expression als die entsprechend gleich alten nicht infizierten und BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Tiere (siehe oben bzw. unten), welche eine überwiegend fleckig verteilte, mittelgradige GLAST-Expression aufwiesen.

In der Gruppe der **BoDV-1-infizierten** Tiere (Abb. 38, grün) zeigten die **wt-Mäuse** zu beiden Zeitpunkten 21 und 42 dpi eine überwiegend diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion im Neuropil (Abb. 39, unten; Abb. 40, rechts), was eine stärkere GLAST-Expression als bei

den nicht infizierten wt-Mäusen darstellte und vergleichbar mit den nicht infizierten TNF-tg/tg-Mäusen war (siehe oben).

Bei den **BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen** zeigten die Tiere 21 dpi durchweg eine fleckig verteilte, mittelgradige Reaktion im Cortex cerebri, Striatum, Thalamus, Rhombencephalon und Stratum subgranulare des Hippocampus sowie eine mittelgradige, eher diffus verteilte Reaktion im Stratum moleculare von Hippocampus und Kleinhirn, wobei die GLAST-Expression mit 42 dpi zunahm und die Tiere zu diesem Zeitpunkt eine überwiegend diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion in den genannten Gehirnregionen aufwiesen.

Die **BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäuse und TNFR2ko-Mäuse** zeigten zu beiden Zeitpunkten 21 und 42 dpi eine vergleichbare, überwiegend mittelgradige GLAST-Expression mit den entsprechend gleich alten, nicht infizierten Tieren (siehe oben).

Das 29 dpi wegen klinischen Auffälligkeiten euthanasierte TNFR1ko-Tier (MR-R1-Nr. 32-V316/14) zeigte eine überwiegend diffus verteilte, hochgradige, granuläre Reaktion vergleichbar mit den 42 Tage alten BoDV-1-infizierten wt- und TNF-tg/tg-Mäusen (siehe oben). Das 40 dpi mit struppigem Fell, gekrümmtem Rücken und gestreckten Hintergliedmaßen tot aufgefundene TNFR2ko-Tier (MR-R2-Nr. 48-V306/14; siehe 4.1.1.) zeigte eine etwas geringere GLAST-Expression als die 29 dpi euthanasierte TNFR1ko-Maus (MR-R1-Nr. 32-V316/14) mit überwiegend fleckig verteilter, mittelgradiger, granulärer Reaktion, vergleichbar mit den 21 Tage alten BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen (siehe oben). Hingegen zeigten die 30 und 37 dpi gestorbenen TNFR2ko-Mäuse (MR-R2-Nr. 33-V67/14 und MR-R2-Nr. 30-V63/14; siehe 4.1.1.) lediglich eine fleckig verteilte, geringgradige, granuläre Reaktion im Cortex cerebri, Striatum und Rhombencephalon sowie eine geringgradige, eher diffus verteilte Reaktion im Stratum moleculare von Hippocampus und Kleinhirn.

Bei allen Mäusen mit entzündlichen Veränderungen (zu welchen ausschließlich BoDV-1-infizierte Tiere gehörten) fiel, wie auch bei der GLT1-Expression (siehe 4.1.3.3.1.) auf, dass häufig in einem schmalen Saum um die mononukleären Entzündungszellinfiltrate nur ein sehr dezenter, granulärer GLAST-Nachweis zu sehen war, unabhängig von der Stärke der Reaktion bzw. Ausprägung der GLAST-Expression im restlichen Gewebe (Abb. 41).

Insgesamt fanden sich bezüglich der GLAST-Expression zwischen den verschiedenen Mausstämmen ($p = 0,0076$) sowie den beiden Alters- bzw. Infektionsgruppen 21 und 42 Tage bzw. 21 und 42 dpi ($p = 0,0071$) statistisch signifikante Unterschiede (siehe Tabelle 18). So

zeigten die TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse, unabhängig vom Infektionsstatus, signifikant weniger GLAST-Expression als die TNF-tg/tg-Mäuse. Ebenfalls zeigten insgesamt die 42 Tage alten Mäuse unabhängig vom Infektionsstatus eine signifikant stärker ausgeprägte GLAST-Expression als die 21 Tage alten Mäuse, was insgesamt für eine altersabhängige Zunahme der GLAST-Expression (42 Tage > 21 Tage) und nicht für eine von der Infektionsdauer abhängige Zunahme spricht. Eine statistisch signifikante Zweifachwechselwirkung ($p = 0,0097$) fand sich nur bezüglich Mausstamm und Infektionsstatus (siehe Tabelle 18). So war in der Gruppe der wt-Mäuse die GLAST-Expression bei den BoDV-1-infizierten Mäusen höher als bei den nicht infizierten Mäusen, dagegen war sie in der Gruppe der TNFR2ko-Mäuse bei den BoDV-1-infizierten Mäusen tendenziell niedriger als bei den nicht infizierten Mäusen (Abb. 38).

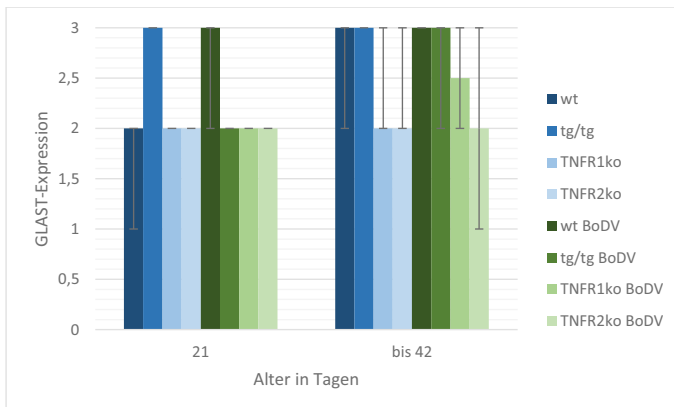


Abb. 38: Nachweis des Glutamat-Aspartat-Transporters bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen

0: kein Nachweis; 1: geringgradige GLAST-Expression; 2: mittelgradige GLAST-Expression; 3: hochgradige GLAST-Expression; Balken: Median; Fehlerbalken: Minimum/Maximum; GLAST: Glutamat-Aspartat-Transporter; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; wt: Wildtyp; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (grün); blau: nicht infiziert

Tabelle 18: Dreifaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm, BoDV-1-Infektion und Alter/Dauer der Infektion auf die GLAST-Expression

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach- wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach- wechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	BoDV-1	Alter/DI	Stamm + BoDV-1	Stamm + Alter/DI	BoDV-1 + Alter/DI	Stamm + BoDV-1 + Alter/DI
0,0076	0,75	0,0071	0,0097	0,47	0,75	0,28

GLAST: Glutamat-Aspartat-Transporter; p-Wert: *probability*; BoDV-1: *Borna disease virus 1*-infiziert; DI: Dauer der Infektion; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede

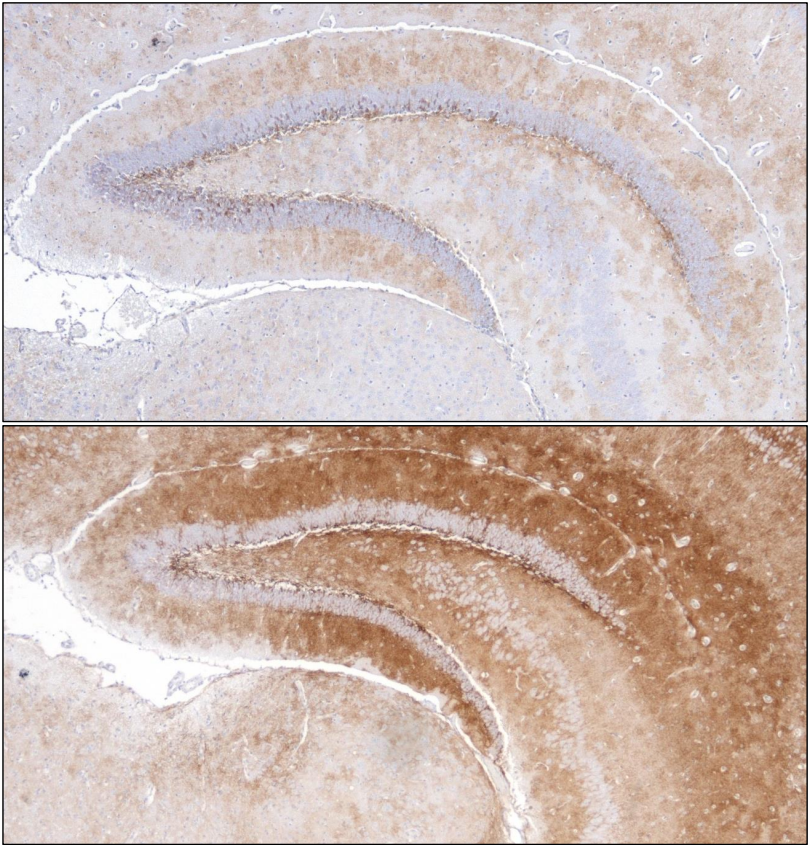


Abb. 39: Nachweis von GLAST im Ammonshorn

Nachweis von GLAST im Ammonshorn bei nicht infizierter 21 Tage alter wt-Maus mit geringgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (oben; Score 1) sowie bei BoDV-1-infizierter wt-Maus 42 dpi mit hochgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (unten; Score 3) im Zytoplasma von Zellkörpern und Zellfortsätzen.

Gesamtvergrößerung: 40x

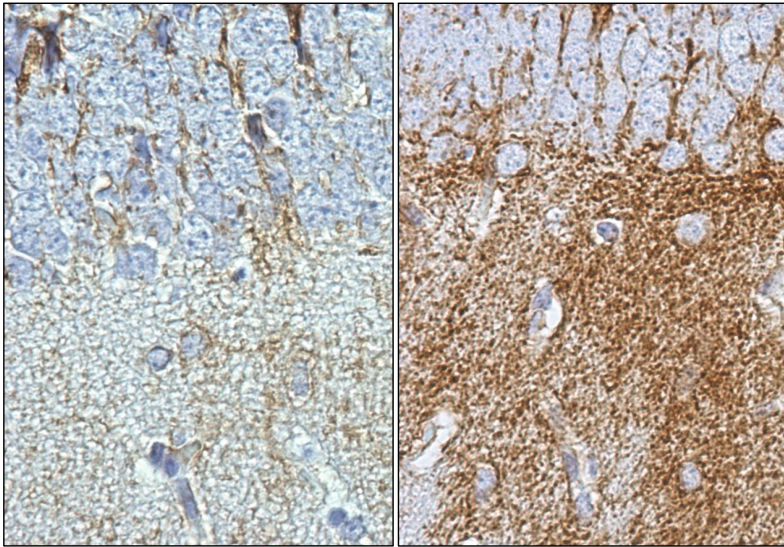


Abb. 40: Nachweis von GLAST im Ammonshorn

Nachweis von GLAST im Ammonshorn bei nicht infizierter 21 Tage alter wt-Maus mit geringgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (links; *Score* 1) sowie bei BoDV-1-infizierter wt-Maus 42 dpi mit hochgradigem, braunem, granulärem Präzipitat (rechts; *Score* 3) im Zytoplasma von Zellkörpern und Zellfortsätzen.

Gesamtvergrößerung: 400x

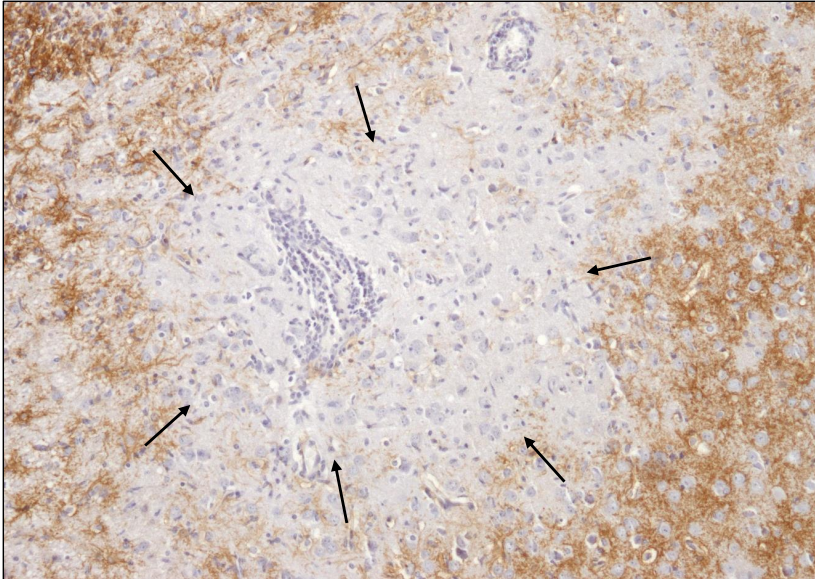


Abb. 41: Verminderter Nachweis von GLAST um perivaskuläre mononukleäre Entzündungszellinfiltrate

Verminderter GLAST-Nachweis mit deutlich abgeschwächter, granulärer Reaktion um mononukleäre, perivaskuläre Entzündungszellinfiltrate (Pfeile) im Vergleich zur umgebenden hochgradigen, diffusen, granulären Reaktion (Score 3) bei BoDV-1-infizierter TNF-tg/tg-Maus 42 dpi im Striatum.

Gesamtvergrößerung: 100x

4.1.3.4. Nachweis von Apoptose und des PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods

4.1.3.4.1. Nachweis von aktivierter Caspase 3

Die immunhistologische Untersuchung zum Nachweis von aktivierter Caspase 3 als Apoptosemarker wurde bei den TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen in der Gruppe der nicht infizierten Tiere (Abb. 42-43, blau), der Mock-infizierten Tiere (Anhang 8.3.7.) sowie der BoDV-1-infizierten Tiere (Abb. 42-43, grün) zu beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 Tage bzw. dpi durchgeführt (siehe auch 3.1.5.3.).

In allen Untersuchungsgruppen (nicht infiziert, Mock-infiziert und BoDV-1-infiziert) und Alters- bzw. Infektionsgruppen 21 und 42 Tage bzw. 21 und 42 dpi fanden sich insgesamt nur sehr wenige Caspase 3-positive Zellen (Abb. 42-44 und Anhang 8.3.7.). Die Caspase 3-positiven Zellen waren insgesamt eher zufällig über die verschiedenen Gehirnregionen verteilt, wobei die wenigsten Caspase 3-positiven Zellen im Rhombencephalon zu finden waren (Abb. 44).

Ausnahmen in der Gruppe der **BoDV-1-infizierten** Mäuse bildeten die 29 dpi wegen klinischen Auffälligkeiten euthanasierte TNFR1ko-Maus (MR-R1-Nr. 32-V316/14; Abb. 45, links) sowie die mit 30, 37 und 40 dpi gestorbenen TNFR2ko-Mäuse (MR-R2-Nr. 33-V67/14, MR-R2-Nr. 30-V63/14 und MR-R2-Nr. 48-V306/14; siehe auch 4.1.1.).

Die 30 dpi an einem generalisierten epileptiformen Krampfanfall gestorbene TNFR2ko-Maus (MR-R2-Nr. 33-V67/14) hatte insgesamt die meisten Caspase 3-positiven Zellen ($n = 152$; Abb. 45, rechts und Abb. 46). Die Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen der anderen drei Mäuse waren nur etwa doppelt (gestorbene TNFR2ko-Mäuse; MR-R2-Nr. 48-V306/14 $n = 10$ bzw. MR-R2-Nr. 30-V63/14 $n = 20$) bzw. dreifach (euthanasierte TNFR1ko-Maus; MR-R1-Nr. 32-V316/14 $n = 33$; Abb. 45, links) so hoch als die Anzahl Caspase 3-positiver Zellen der zu den regulären Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 Tage bzw. dpi untersuchten Tiere (Werte der einzelnen Mäuse zwischen $n = 0$ und $n = 9$; siehe auch Abb. 42-43 und Anhang 8.3.7.). Die meisten Caspase 3-positiven Zellen fanden sich bei diesen Mäusen im Bereich der perivaskulären und meningealen Entzündungszellinfiltrate (Abb. 45-46; siehe auch 4.1.2.1.). Unter den dort vorhandenen Caspase 3-positiven Zellen fanden sich, unabhängig von Mausstamm und Alter bzw. Infektionsdauer der Tiere, sowohl kleine Zellen mit kommaförmigem Zellkern, welche aktivierten Mikroglia entsprachen (Abb. 46, Kreise) als auch kleine im Durchmesser ca. 7 – 8 μm große, runde Zellen mit basophilem Zellkern mit dichtem Chromatin und einem schmalen Zytoplasmasaum, welche benachbart zu Neuronen aber auch im Virchow-Robinschen-Raum oder im unmittelbar umgebenden Neuropil zu finden waren (Gliazellen bzw. Lymphozyten, Abb. 45-46, Pfeilspitzen). Auch waren in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate immer wieder Caspase 3-positive Neurone (Abb. 45-46, schwarze Pfeile) und auch vereinzelte Caspase 3-positive Astrozyten zu finden, wobei keine der aktivierten hypertrophen Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen Caspase 3-positiv waren. In den Gefäßwänden fanden sich ebenfalls immer wieder Caspase-3-positive plumpe spindelförmige Zellen, bei welchen es sich am ehesten um aktivierte Endothelzellen handelt (Abb. 46, rote Pfeile).

Insgesamt fanden sich weder zwischen den untersuchten Mausstämmen (TNFR1ko und TNFR2ko) noch zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl Caspase 3-positiver Zellen. Es konnte jedoch insgesamt betrachtet zwischen den beiden Alters- bzw. Infektionsgruppen 21 und 42 Tage bzw. 21 und 42 dpi ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,011$) festgestellt werden, wobei die 42 Tage alten bzw. 42 dpi-Tiere insgesamt betrachtet mehr Caspase-3-positive Zellen zeigten als die 21 Tage alten bzw. 21 dpi-Tiere (Tabelle 19 und Abb. 42-43). Statistisch signifikante Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Parametern fanden sich nicht, wobei tendenziell die BoDV-1-Infektion bei den TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen 42 dpi einen

ERGEBNISSE

Einfluss auf die Anzahl Caspase 3-positiver Zellen zu haben scheint (Tabelle 19 und Abb. 42-43).

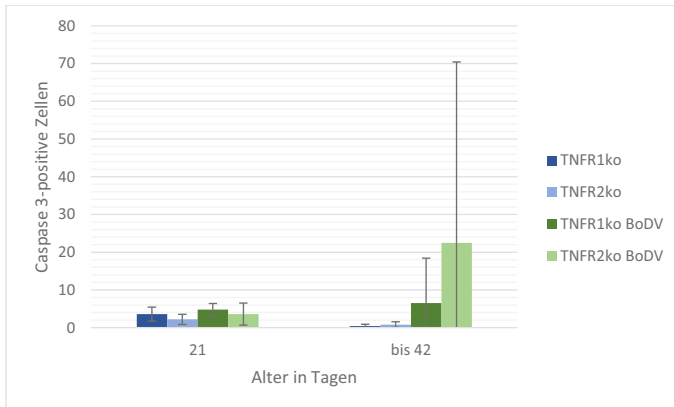


Abb. 42: Anzahl Caspase 3-positiver Zellen bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten TNF-Rezeptor-*knockout*-Mäusen

Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}); Fehlerbalken: Standardabweichung; bis 42: > 21 und \leq 42 Tage; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (grün); blau: nicht infiziert

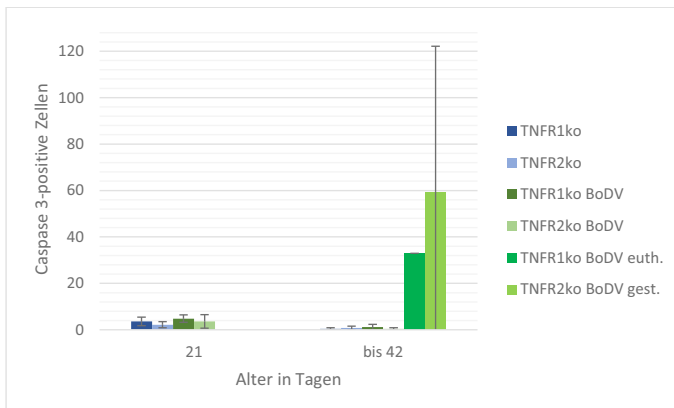


Abb. 43: Anzahl Caspase 3-positiver Zellen bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten TNF-Rezeptor-*knockout*-Mäusen mit separater Betrachtung der euthanasierten BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Maus und der gestorbenen BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse

Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}); Fehlerbalken: Standardabweichung; bis 42: > 21 und \leq 42 Tage; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (grün); blau: nicht infiziert; euth.: euthanasiert; gest.: gestorben

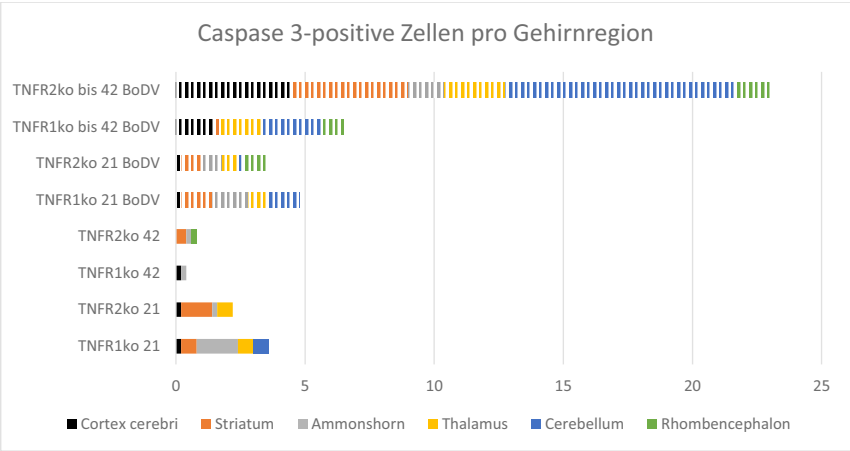


Abb. 44: Anzahl Caspase 3-positiver Zellen pro Gehirnregion bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen

Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}); TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; 21/42: Alter in Tagen; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (gestreift)

Tabelle 19: Multiple Poisson-Regression zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm, BoDV-1-Infektion und Alter/Dauer der Infektion auf die Anzahl Caspase 3-positiver Zellen

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach- wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach- wechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	BoDV-1	Alter/DI	Stamm + BoDV-1	Stamm + Alter/DI	BoDV-1 + Alter/DI	Stamm + BoDV-1 + Alter/DI
0,51	0,67	0,011	0,97	0,31	0,27	0,84

p-Wert: *probability*; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; DI: Dauer der Infektion; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede

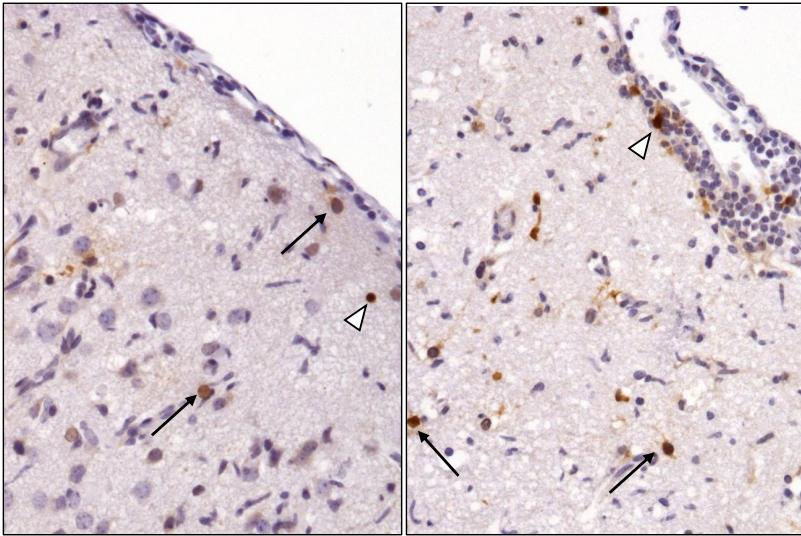


Abb. 45: Nachweis Caspase 3-positiver Zellen im Cortex cerebri

Mehrere Caspase 3-positive Neurone (Pfeile) sowie positive kleine runde Zellen (Pfeilspitzen), bei welchen es sich um Gliazellen oder Lymphozyten handelt, bei BoDV-1-infizierter und 29 dpi euthanasierter TNFR1ko-Maus (links) sowie bei BoDV-1-infizierter und 30 dpi an generalisiertem epileptiformem Krampfanfall gestorbener TNFR2ko-Maus (rechts) im Cortex cerebri im Bereich der entzündlichen Veränderungen/Meningitis.

Gesamtvergrößerung: 200x

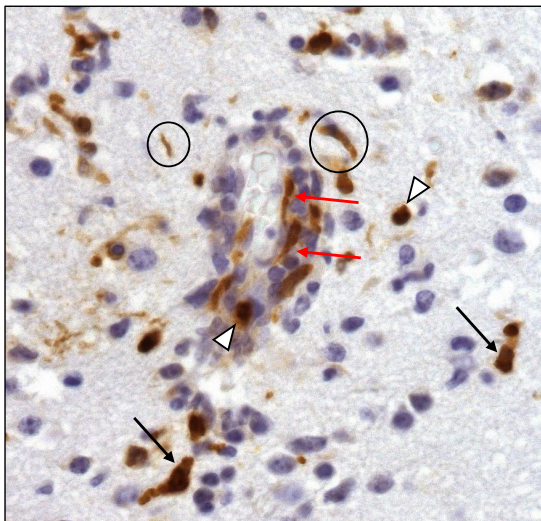


Abb. 46: Nachweis Caspase 3-positiver Zellen in der Umgebung eines perivaskulären Entzündungszellinfiltrats

Caspase 3-positive Neurone (schwarze Pfeile), positive kleine runde Zellen (Pfeilspitzen), bei welchen es sich am ehesten um Lymphozyten handelt, sowie positive kommaförmige aktivierte Mikroglia (Kreise) in der Umgebung eines perivaskulären mononukleären Entzündungszellinfiltrats bei BoDV-1-infizierter und 30 dpi an generalisiertem epileptiformem Krampfanfall gestorbener TNFR2ko-Maus. Daneben fanden sich auch Caspase-3-positive aktivierte Endothelzellen (rote Pfeile). Gesamtvergrößerung: 400x

4.1.3.4.2. Nachweis des *apoptosis inducing factors* (AIF)

Die Untersuchung im Hinblick auf das Vorliegen des Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods mittels nukleärem Nachweis von AIF (= AIF-positiv) erfolgte bei allen Mausgruppen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko) (Abb. 47-49; siehe auch 3.1.5.3. und Anhang 8.3.8.).

Die Spanne an AIF-positiven Zellen bei den verschiedenen Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko), Infektionsgruppen (nicht infiziert, Mock- und BoDV-1-infiziert) und Altersgruppen (21 und 42 Tage) reichte von durchschnittlich 5 bis 116 AIF-positiven Zellen (Abb. 47-49 und Anhang 8.3.8.). Insgesamt handelte es sich bei der Mehrzahl der AIF-positiven Zellen um kleinere ca. 8 µm im Durchmesser große, runde Zellen mit einem dünnen Saum von Zytoplasma und einem basophilen Zellkern mit dicht gepacktem Chromatin, passend zu Oligodendrozyten (Abb. 50). AIF-positive Zellen mit Astrozyten- oder Neuronenmorphologie waren ebenfalls vorhanden, aber in geringerer Anzahl. Weiterhin waren die meisten AIF-positiven Zellen in den Gehirnregionen Thalamus, Cerebellum und

Rhombencephalon zu finden, hingegen fanden sich im Striatum nur wenige und im Cortex cerebri und Ammonshorn nur vereinzelte bis gar keine AIF-positiven Zellen (Abb. 49). Es gab keine Assoziation der AIF-positiven Zellen mit den entzündlichen Veränderungen, insbesondere waren keine der aktivierten hypertrophen Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen AIF-positiv.

In der Gruppe der **nicht infizierten** Tiere (Abb. 47-48, blau) hatten die **wt-Mäuse** mit 42 Tagen im Durchschnitt etwa doppelt so viele AIF-positive Zellen ($\bar{x} = 72$) als mit 21 Tagen ($\bar{x} = 34$).

Die **nicht infizierten TNF-tg/+ -Tiere** wiesen jeweils zu den beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 Tage im Durchschnitt eine ähnliche Anzahl AIF-positiver Zellen auf ($\bar{x} = 35$ bzw. 39), welche vergleichbar war mit der Anzahl AIF-positiver Zellen bei den 21 Tage alten wt-Mäusen (siehe oben).

Die **nicht infizierten TNF-tg/tg-Mäuse** hatten zu beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 Tage im Durchschnitt gleich viele AIF-positive Zellen ($\bar{x} = 65$), wobei die Anzahl der AIF-positiven Zellen knapp doppelt so hoch wie bei den 21 und 42 Tage alten nicht infizierten TNF-tg/+ -Mäusen und vergleichbar mit der Anzahl der AIF-positiven Zellen der nicht infizierten 42 Tage alten wt-Mäuse war (siehe oben).

Bei den **nicht infizierten TNFR1ko-Mäusen** nahm die durchschnittliche Anzahl an AIF-positiven Zellen von 21 zu 42 Tagen um etwa ein Drittel zu (von $\bar{x} = 45$ zu 75), wobei die durchschnittliche Anzahl bei den 42 Tage alten TNFR1ko-Mäusen ($\bar{x} = 75$) in etwa der Anzahl der AIF-positiven Zellen der 42 Tage alten nicht infizierten wt-Mäuse entsprach (siehe oben).

Der Durchschnitt der AIF-positiven Zellen lag bei den **nicht-infizierten** 42 Tage alten **TNFR2ko-Mäusen** etwa dreimal so hoch ($\bar{x} = 116$) als bei den 21 Tage alten Tieren dieser Gruppe ($\bar{x} = 40$) und damit auch deutlich höher als bei allen anderen Mausgruppen, wobei die durchschnittliche Anzahl bei den nicht infizierten TNFR2ko-Mäusen mit 21 Tagen in etwa vergleichbar war mit der Anzahl AIF-positiver Zellen der 21 Tage alten nicht infizierten wt-Mäuse (siehe oben).

In der Gruppe der **Mock-infizierten** Tiere war bei den **wt-Mäusen** (siehe Anhang 8.3.8.) die durchschnittliche Anzahl AIF-positiver Zellen zu beiden Zeitpunkten ($\bar{x} = 21$ bzw. 16) vergleichbar mit der Anzahl AIF-positiver Zellen bei den BoDV-1-infizierten 21 Tage alten wt-Mäusen ($\bar{x} = 29$, siehe unten) und lag damit etwas unterhalb der Anzahl AIF-positiver Zellen

der 21 Tage alten nicht infizierten wt-Mäuse ($\bar{x} = 34$) und deutlich unterhalb der Anzahl AIF-positiver Zellen der 42 Tage alten nicht infizierten wt-Mäuse ($\bar{x} = 72$, siehe oben).

Bei den **Mock-infizierten TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäusen** (siehe Anhang 8.3.8.) lag die durchschnittliche Anzahl mit 21 Tagen ($\bar{x} = 5$ bzw. 16) deutlich unter der Anzahl AIF-positiver Zellen bei den gleich alten BoDV-1-infizierten TNF-tg/+ ($\bar{x} = 34$) bzw. TNF-tg/tg-Mäusen ($\bar{x} = 66$). Mit 42 Tagen ($\bar{x} = 60$ bzw. 44) war die durchschnittliche Anzahl AIF-positiver Zellen jedoch etwas höher als die Anzahl AIF-positiver Zellen bei den gleich alten, BoDV-1-infizierten TNF-tg/+ ($\bar{x} = 42$) bzw. TNF-tg/tg-Mäusen ($\bar{x} = 28$, siehe unten). Im Vergleich zu den jeweils gleich alten, nicht infizierten TNF-tg/+ ($\bar{x} = 35$ bzw. 39) bzw. TNF-tg/tg-Mäusen ($\bar{x} = 65$), war die Anzahl an AIF-positiven Zellen bei den Mock-infizierten TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäusen mit 21 Tagen ($\bar{x} = 5$ bzw. 16) jeweils deutlich niedriger, mit 42 Tagen jedoch bei den TNF-tg/+ Mäusen deutlich höher ($\bar{x} = 60$) und bei den TNF-tg/tg-Mäusen deutlich niedriger ($\bar{x} = 44$, siehe oben).

Die **Mock-infizierten TNFR1ko-Mäuse** (siehe Anhang 8.3.8.) hatten mit 21 Tagen eine vergleichbare durchschnittliche Anzahl AIF-positiver Zellen ($\bar{x} = 49$) als die gleich alten BoDV-1-infizierten Mäuse ($\bar{x} = 56$, siehe unten). Mit 42 Tagen zeigten die Mock-infizierten TNFR1ko-Mäuse jedoch etwa doppelt so viele AIF-positive Zellen ($\bar{x} = 114$) als die gleich alten, BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäuse ($\bar{x} = 55$, siehe unten). Im Vergleich zu den jeweils gleich alten, nicht infizierten TNFR1ko-Mäusen ($\bar{x} = 45$ bzw. 75, siehe oben), war die Anzahl AIF-positiver Zellen bei den Mock-infizierten Mäusen mit 21 Tagen vergleichbar ($\bar{x} = 49$), mit 42 Tagen jedoch deutlich höher ($\bar{x} = 114$).

Bei den **Mock-infizierten TNFR2ko-Mäusen** (siehe Anhang 8.3.8.) lag die durchschnittliche Anzahl AIF-positiver Zellen mit 21 Tagen ($\bar{x} = 19$) bei weniger als der Hälfte und mit 42 Tagen ($\bar{x} = 26$) bei der Hälfte der Anzahl AIF-positiver Zellen der entsprechend gleich alten, BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse ($\bar{x} = 47$ bzw. 50, siehe unten). Im Vergleich zu den jeweils gleich alten, nicht infizierten TNFR2ko-Mäusen ($\bar{x} = 40$ bzw. 116, siehe oben), war die Anzahl AIF-positiver Zellen bei den Mock-infizierten Mäusen zu beiden Zeitpunkten deutlich niedriger ($\bar{x} = 19$ bzw. 26).

In der Gruppe der **BoDV-1-infizierten Tiere** (Abb. 47-48, grün) lag bei den **wt-Mäusen** eine nahezu Verdopplung der durchschnittlichen Anzahl AIF-positiver Zellen mit 42 Tagen ($\bar{x} = 53$) im Vergleich zur Anzahl AIF-positiver Zellen mit 21 Tagen vor ($\bar{x} = 29$). Die Zunahme mit der Infektionsdauer ist vergleichbar mit der altersabhängigen Zunahme der nicht infizierten wt-Mäuse. Die Gesamtzahlen der AIF-positiven Zellen bei wt-Mäusen lagen jedoch mit 21 Tagen,

unabhängig vom Infektionsstatus, jeweils deutlich unter denen der TNF-tg/tg-Mäuse (siehe oben und unten).

Die **BoDV-1-infizierten TNF-tg/+-Tiere** wiesen gleichartig wie die nicht infizierten TNF-tg/+ Mäuse jeweils zu den beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 Tage im Durchschnitt eine ähnliche Anzahl AIF-positiver Zellen auf (\bar{x} = 34 bzw. 42), welche ebenfalls vergleichbar war mit der Anzahl AIF-positiver Zellen bei den 21 Tage alten wt-Mäusen (siehe oben). Die Anzahl an AIF-positiven Zellen war 21 dpi vergleichbar mit der Anzahl bei den BoDV-1-infizierten wt-Mäusen (\bar{x} = 29), jedoch kam es, anders als bei den BoDV-1-infizierten wt-Mäusen (siehe oben), bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/+-Tieren zu keiner deutlichen Zunahme mit 42 dpi.

Die durchschnittliche Anzahl an AIF-positiven Zellen der 21 Tage alten **BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäuse** (\bar{x} = 66) war mit der Anzahl AIF-positiver Zellen der nicht infizierten TNF-tg/tg-Mäuse vergleichbar (\bar{x} = 65), wobei sich jedoch die durchschnittliche Anzahl 42 dpi bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen mehr als halbierte (\bar{x} = 28), was bei den nicht infizierten TNF-tg/tg-Mäusen nicht der Fall war (\bar{x} = 65, siehe oben). Demnach liegt bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen ein umgekehrtes Bild bezüglich der Anzahl AIF-positiver Zellen im Verlauf der Infektionsdauer vor, als bei den BoDV-1-infizierten wt-Mäusen, bei welchen sich die Anzahl mit 42 dpi verdoppelt und nicht halbiert (siehe oben).

Bei den **BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäusen** gab es so gut wie keinen Unterschied zwischen den 21 und 42 Tage alten Tieren bezüglich der durchschnittlichen Anzahl AIF-positiver Zellen (\bar{x} = 56 bzw. 55), welche etwas über der Anzahl AIF-positiver Zellen der nicht infizierten 21 Tage alten (\bar{x} = 45) und deutlich unter der Anzahl der nicht infizierten 42 Tage alten TNFR1ko-Mäuse (\bar{x} = 75, siehe oben) lag. Es lag also kein Anstieg mit der Infektionsdauer vor. Weiterhin war die Anzahl AIF-positiver Zellen bei den BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäusen 21 und 42 dpi vergleichbar mit der Anzahl AIF-positiver Zellen der BoDV-1-infizierten wt-Mäuse 42 dpi (\bar{x} = 53) und fiel etwas geringer aus als die Anzahl AIF-positiver Zellen der BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäuse 21 dpi (\bar{x} = 66, siehe oben).

Bei den **BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäusen** war die durchschnittliche Anzahl AIF-positiver Zellen mit 21 und 42 Tagen etwa gleich hoch (\bar{x} = 47 bzw. 50), wobei sie damit zwar über der Anzahl AIF-positiver Zellen der 21 Tage alten nicht infizierten TNFR2ko-Mäuse (\bar{x} = 40), aber noch deutlich unter der Anzahl der AIF-positiven Zellen der 42 Tage alten nicht infizierten TNFR2ko-Mäuse lag (\bar{x} = 116, siehe oben). Vergleichbar war die Anzahl der AIF-positiven Zellen der BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse jedoch mit der Anzahl AIF-positiver Zellen der BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäuse 21 und 42 dpi (\bar{x} = 56 bzw. 55) sowie mit der Anzahl der

BoDV-1-infizierten wt-Mäuse 42 dpi (\bar{x} = 53, siehe oben). Demnach lag kein Unterschied zwischen den BoDV-1-infizierten TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen bezüglich der Anzahl AIF-positiver Zellen vor, unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt bzw. der Infektionsdauer der Tiere.

Die wegen Auffälligkeiten 29 dpi euthanasierte BoDV-1-infizierte TNFR1ko-Maus (MR-R1-Nr. 32-V316/14; siehe 4.1.1.) stach nicht hervor und entsprach mit ihrer Anzahl an AIF-positiven Zellen (n = 47) der Gruppe der 42 Tage alten BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäuse (\bar{x} = 55, siehe oben).

Die 30, 37 und 40 dpi gestorbenen BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse (MR-R2-Nr. 33-V67/14, MR-R2-Nr. 30-V63/14 und MR-R2-Nr. 48-V306/14; siehe 4.1.1.) lagen mit Einzelwerten zwischen n = 1 und n = 13 AIF-positiven Zellen (Abb. 48) deutlich unter der Gruppe der 42 Tage alten BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Tiere (\bar{x} = 50, siehe oben). Der Nachweis AIF-positiver Zellen war hier jedoch aufgrund des Erhaltungszustands des Gewebes nur eingeschränkt beurteilbar.

Insgesamt fanden sich bezüglich der Anzahl AIF-positiver Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede, weder zwischen den Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko), noch zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen oder den beiden Altersgruppen 21 und 42 Tage bzw. Infektionsgruppen 21 und 42 dpi (Tabelle 20). Es fanden sich auch keine statistisch signifikanten Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Parametern (Tabelle 20).

ERGEBNISSE

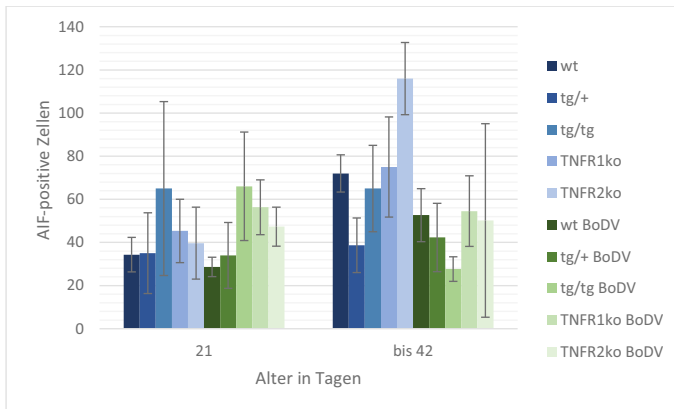


Abb. 47: Anzahl AIF-positiver Zellen bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen
 Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}); Fehlerbalken: Standardabweichung; AIF: *apoptosis inducing factor*; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (grün), blau: nicht infiziert

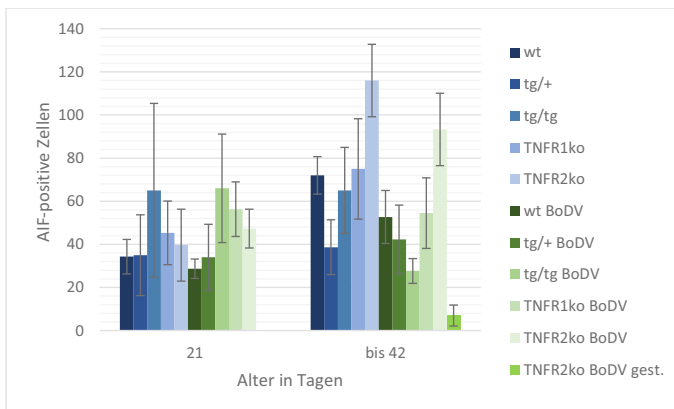


Abb. 48: Anzahl AIF-positiver Zellen bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen mit separater Betrachtung der gestorbenen BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse
 Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}); Fehlerbalken: Standardabweichung; AIF: *apoptosis inducing factor*; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (grün); blau: nicht infiziert; gest.: gestorben

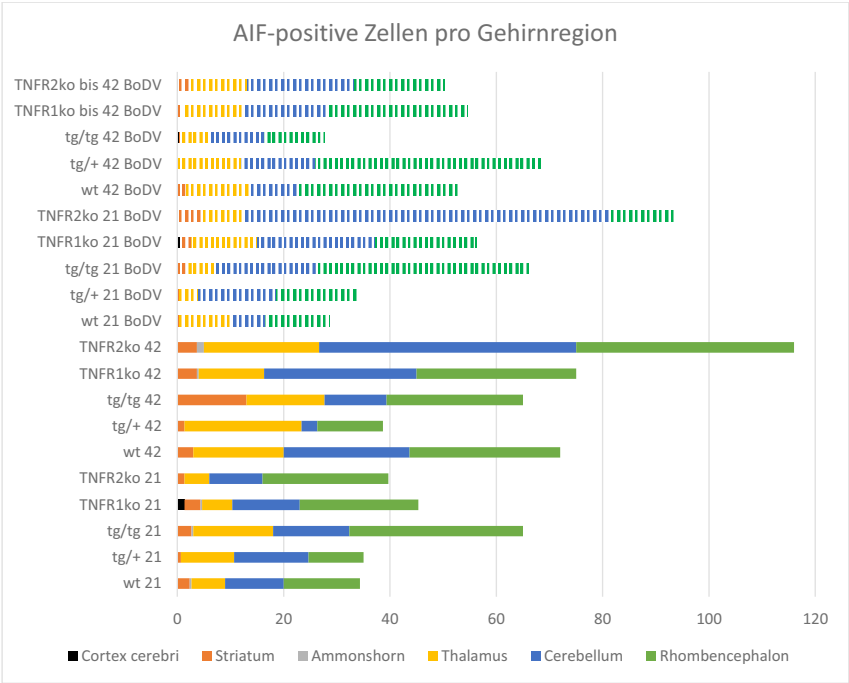


Abb. 49: Anzahl AIF-positiver Zellen pro Gehirnregion bei nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen

Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}); AIF: *apoptosis inducing factor*; wt: Wildtyp; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; 21/42: Alter in Tagen; bis 42: > 21 und ≤ 42 Tage; BoDV: *Borna disease virus* 1-infiziert (gestreift)

Tabelle 20: Multiple Poisson-Regression (mit Wald-Test) zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm, BoDV-1-Infektion und Alter/Dauer der Infektion auf die Anzahl AIF-positiver Zellen

Haupteffekte (p-Wert)			Zweifach- wechselwirkungen (p-Wert)			Dreifach- wechselwirkungen (p-Wert)
Stamm	BoDV-1	Alter/DI	Stamm + BoDV-1	Stamm + Alter/DI	BoDV-1 + Alter/DI	Stamm + BoDV-1 + Alter/DI
0,15	0,73	0,11	0,95	0,083	0,88	0,67

AIF: *apoptosis inducing factor*; p-Wert: *probability*; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; DI: Dauer der Infektion; blaue Schrift: mit zusätzlichem Wald-Test ermittelt

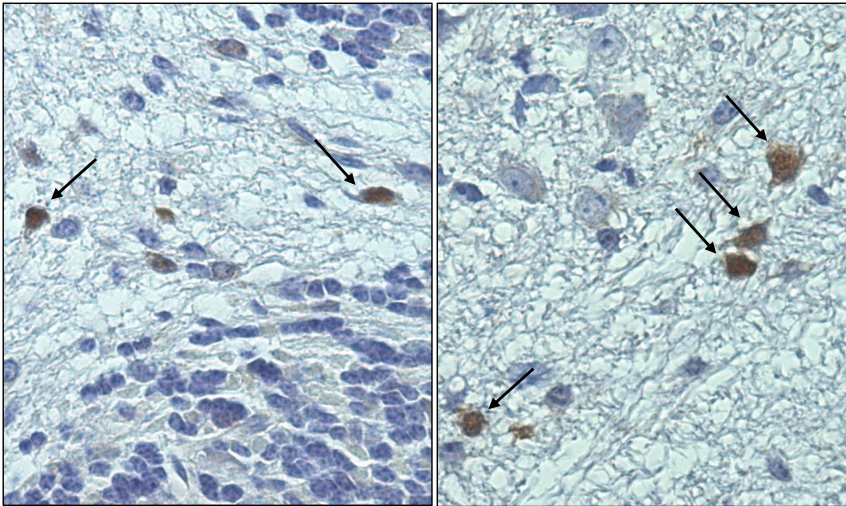


Abb. 50: Nachweis von AIF-positiven Zellen im Gehirn

AIF-Nachweis im Zellkern von kleinen runden Zellen, bei welchen es sich um Oligodendrozyten handelt, im Kleinhirn (links) und Rhombencephalon (rechts) bei BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen 21 dpi.

Gesamtvergrößerung: 400x

4.2. IN VITRO UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

4.2.1. MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde mit nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten, die aus allen Mausstämmen präpariert wurden, durchgeführt um den Effekt verschieden hoher TNF-, Glutamat- bzw. kombinierter TNF- und Glutamatkonzentrationen auf die Astrozyten zu untersuchen.

4.2.1.1. Nicht infizierte Astrozyten

Die nicht infizierten Astrozyten aus allen Mausstämmen wurden jeweils mit verschiedenen Dosen Glutamat (5 mM, 50 mM), TNF (0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) bzw. Glutamat und TNF (alle Kombinationen) behandelt (siehe auch 3.2.4.1., Tabelle 10).

In der Gruppe der Astrozyten aus **wt-Mäusen** führte die **TNF-Behandlung** zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte um bis zu ca. 30 % (Abb. 51, blau).

Glutamat führte nur in der niedrigeren Dosierung von 5 mM zu einer geringgradigen Verminderung der optischen Dichte um ca. 13 %, wohingegen 50 mM Glutamat keinen Effekt hatte und hier die optische Dichte vergleichbar war mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen (Abb. 51, gelb).

Die Behandlung mit 0,5 ng/ml TNF in **Kombination** mit beiden Glutamatdosen 5 und 50 mM erbrachte eine vergleichbare optische Dichte im MTT-Assay als die alleinige Behandlung mit 0,5 ng/ml TNF. In allen weiteren Kombinationen mit TNF und Glutamat (Abb. 51, grün und braun) war die optische Dichte vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen, was zeigt, dass der dosisabhängige TNF-Effekt durch die zusätzliche Behandlung mit Glutamat aufgehoben wird.

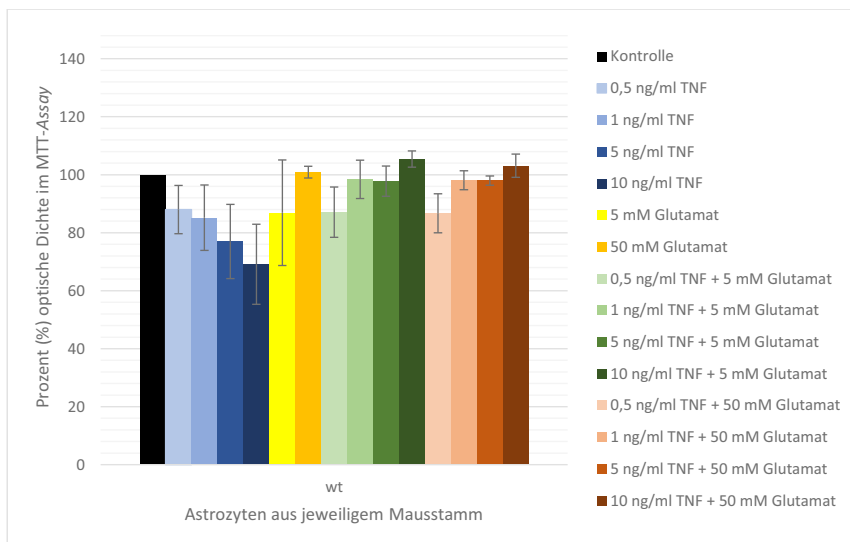


Abb. 51: Ergebnis des MTT-Assays von nicht infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; wt: Wildtyp; Kontrolle: unbehandelte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 3); Fehlerbalken: Standardabweichung

In der Gruppe der Astrozyten aus **TNF-tg/tg-Mäusen** führte die **TNF-Behandlung** zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte um bis zu ca. 34 % (Abb. 52, blau).

Die alleinige **Glutamatbehandlung** (Abb. 52, gelb) zeigte in keiner Dosierung einen eindeutigen Effekt, die optische Dichte war vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

In der **kombinierten Behandlung** mit TNF und Glutamat (Abb. 52, grün und braun) kam es zwar zu einer Verminderung der optischen Dichte um ca. 10 – 20 % in allen Kombinationen, eine Abhängigkeit von der TNF-Dosis lag jedoch, im Vergleich zur alleinigen TNF-Behandlung (Abb. 50, blau), nicht mehr vor.

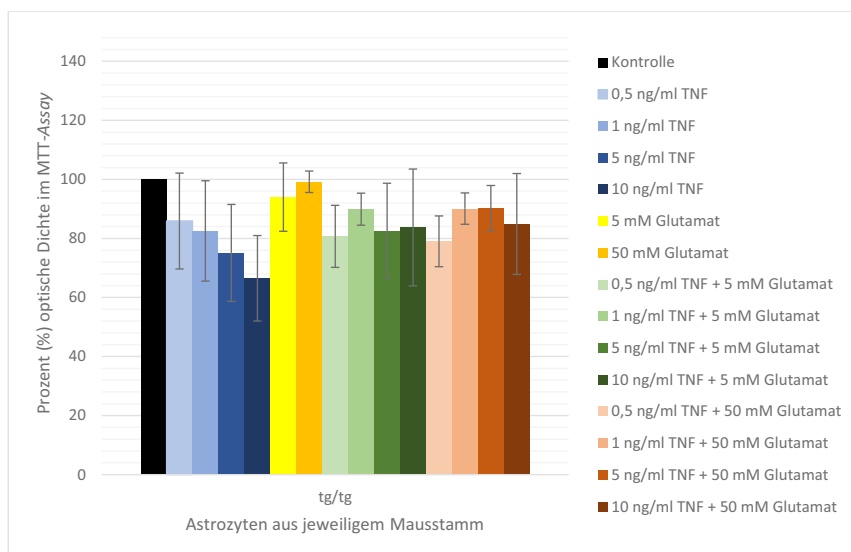


Abb. 52: Ergebnis des MTT-Assays von nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; tg/tg: homozygot TNF-transgen; Kontrolle: unbehandelte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 3); Fehlerbalken: Standardabweichung

In der Gruppe der Astrozyten aus **TNFR1ko-Mäusen** führte die **TNF-Behandlung** zu einer sehr dezenten, aber dennoch dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte um bis zu ca. 11 % (Abb. 53, blau).

Die alleinige **Glutamatbehandlung** (Abb. 53, gelb) zeigte in keiner Dosierung einen eindeutigen Effekt, die optische Dichte war vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

Die **kombinierte Behandlung** mit TNF und Glutamat führte meist zu einer vergleichbaren optischen Dichte mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen und erbrachte nur in ganz vereinzelten Kombinationen (z.B. 0,5 ng/ml TNF + 50 mM Glutamat oder 10 ng/ml TNF + 50 mM Glutamat) eine sehr geringgradige Verminderung der optischen Dichte um lediglich bis zu ca. 9 % (Abb. 53, grün und braun).

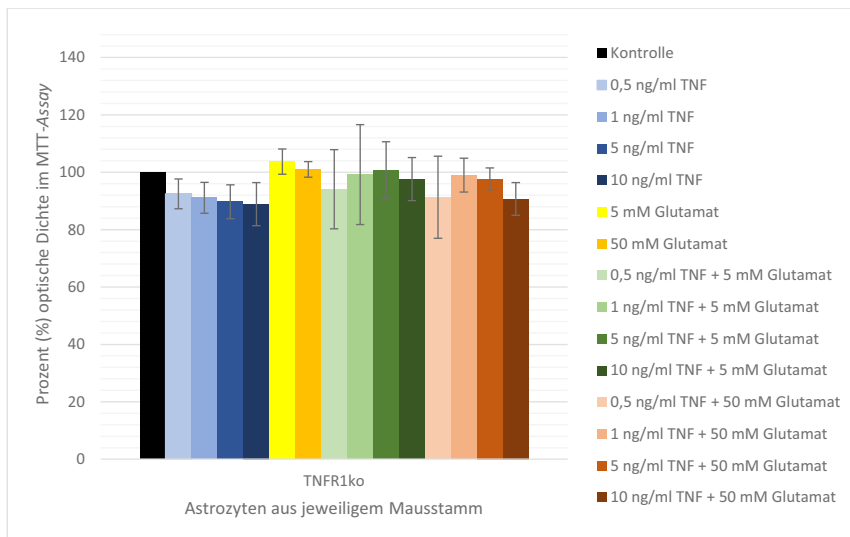


Abb. 53: Ergebnis des MTT-Assays von nicht infizierten Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; Kontrolle: unbehandelte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 4); Fehlerbalken: Standardabweichung

In der Gruppe der Astrozyten aus **TNFR2ko-Mäusen** führte die **TNF-Behandlung** zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte um bis zu ca. 32 % (Abb. 54, blau).

Die alleinige **Glutamatbehandlung** (Abb. 54, gelb) zeigte in keiner Dosierung einen eindeutigen Effekt, die optische Dichte war nahezu vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

In der **kombinierten Behandlung** mit TNF und Glutamat kam es vor allem in Kombination mit 5 mM Glutamat zu einer Erhöhung der optischen Dichte um bis zu knapp 24 % (10 ng/ml TNF + 5 mM Glutamat), jedoch unabhängig von der TNF-Dosis (Abb. 52, grün). Die Astrozyten, welche mit verschiedenen TNF-Dosen in Kombination mit 50 mM Glutamat behandelt wurden

(Abb. 54, braun), zeigten eine mehrheitlich vergleichbare optische Dichte mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen, was zeigt, dass die zusätzliche Behandlung mit Glutamat den dosisabhängigen TNF-Effekt aufhebt.

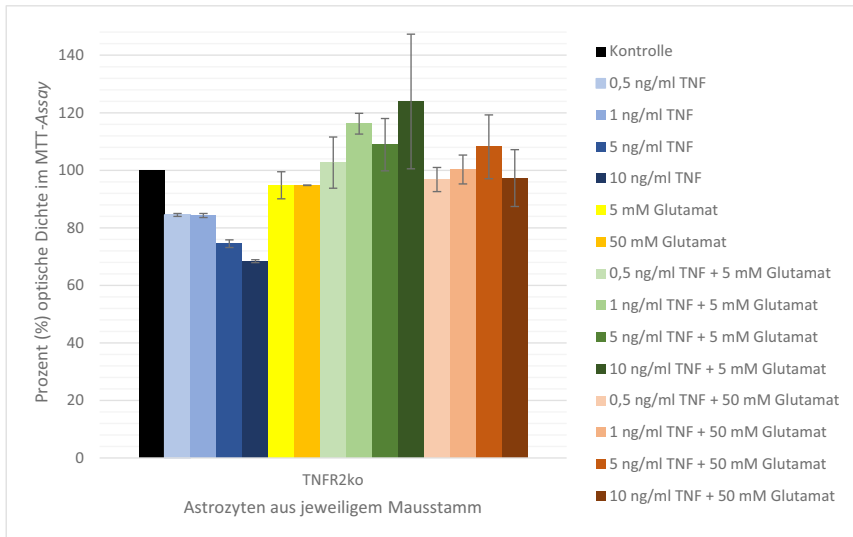


Abb. 54: Ergebnis des MTT-Assays von nicht infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; Kontrolle: unbehandelte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 2); Fehlerbalken: Standardabweichung

Insgesamt betrachtet führte **TNF** (Abb. 51-55, blau) bei Astrozyten aus allen Mausstämmen zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte im MTT-Assay, wobei der Effekt bei Astrozyten aus wt-, TNF-tg/tg- und TNFR2ko-Mäusen deutlich ausgeprägt war (Verminderung um bis zu 30 – 34 %) und bei Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen schwächer ausfiel (Verminderung um bis zu 21 %).

Glutamat (Abb. 51-55, gelb) hatte insgesamt keinen eindeutigen Effekt, die optische Dichte war bei den meisten Glutamat-behandelten Astrozyten vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen. Lediglich bei den Astrozyten aus wt-Mäusen führte die Behandlung mit 5 mM Glutamat zu einer geringgradigen Verminderung (um ca. 13 %) der optischen Dichte im MTT-Assay.

Durch die **kombinierte Behandlung** mit TNF und Glutamat (Abb. 51-55, grün und braun) kam es in Astrozyten aus allen Mausstämmen zur Aufhebung des alleinigen TNF-Effekts, welcher mit einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte einherging, wobei nach kombinierter TNF- und Glutamatbehandlung bei den Astrozyten aus wt- und TNFR1ko-Mäusen kein deutlicher Unterschied mehr zu den unbehandelten Kontrollen bestand. Bei den kombiniert mit TNF und Glutamat behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen war zwar die Dosisabhängigkeit des TNF-Effekts aufgehoben, die optische Dichte war jedoch weiterhin vermindert und zwar in allen kombinierten Dosierungen um bis zu 21 %, unabhängig von der TNF-Dosis. Bei den kombiniert behandelten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen kam es in Kombination mit 5 mM Glutamat zu einer teils deutlichen Zunahme der optischen Dichte um bis zu 24 %, in Kombination mit 50 mM Glutamat fand sich jedoch kein deutlicher Unterschied zur optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

Die Effekte der verschiedenen Astrozyten- und Behandlungsgruppen sind insgesamt in Abbildung 55 gegenübergestellt (siehe auch Anhang 8.4.1. und 8.4.3.).

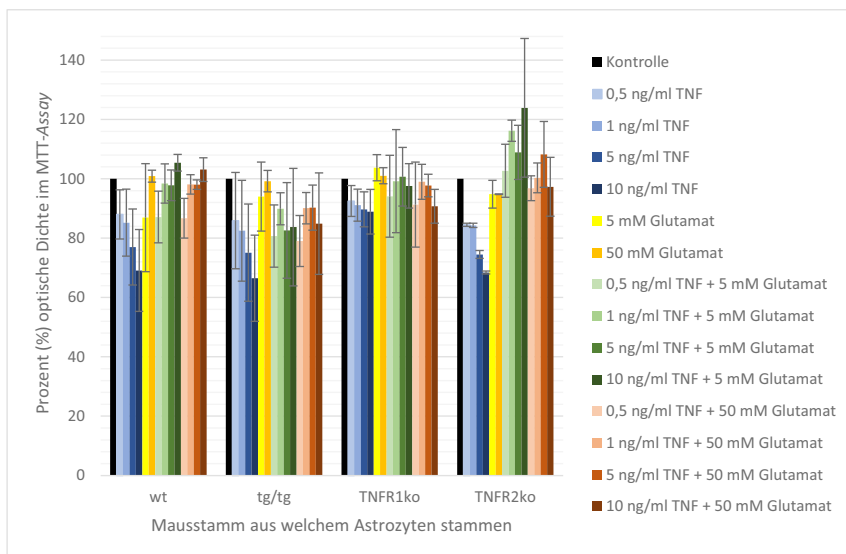


Abb. 55: Übersicht Ergebnis des MTT-Assays von nicht infizierten Astrozyten aus allen untersuchten Mausstämmen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung
 MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; wt: Wildtyp; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; Kontrolle: unbehandelte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 2-4); Fehlerbalken: Standardabweichung

4.2.1.2. *Borna disease virus 1* (BoDV-1)-infizierte Astrozyten

Die BoDV-1-infizierten Astrozyten aus allen Mausstämmen wurden jeweils mit verschiedenen Dosen Glutamat (5 mM, 50 mM), TNF (0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml) bzw. Glutamat und TNF (alle Kombinationen) behandelt (siehe auch 3.2.4.1., Tabelle 10).

In der Gruppe der BoDV-1-infizierten Astrozyten aus **wt-Mäusen** führte die **TNF-Behandlung** zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte um bis zu knapp 20 % (Abb. 56, blau).

Die alleinige Behandlung mit **Glutamat** führte in beiden Dosierungen dagegen zu einer Erhöhung der optischen Dichte um ca. 12 – 15 % im Vergleich zur optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen (Abb. 56, gelb).

In der **kombinierten Behandlung** mit TNF und Glutamat kam es in allen Kombinationen zu einer dosisunabhängigen Erhöhung der optischen Dichte um bis zu knapp 20 % (Abb. 56, grün und braun), was zeigt, dass Glutamat den dosisabhängigen TNF-Effekt aufhebt.

ERGEBNISSE

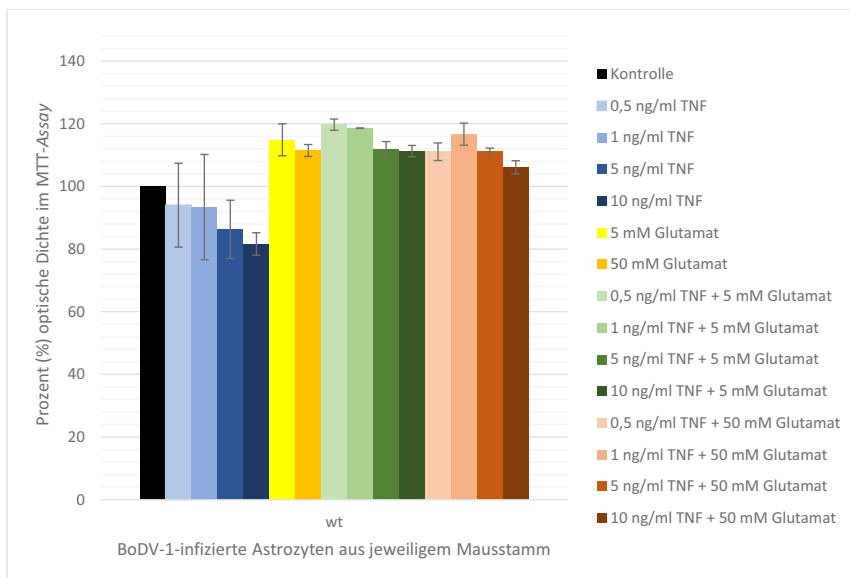


Abb. 56: Ergebnis des MTT-Assays von BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; wt: Wildtyp; Kontrolle: unbehandelte BoDV-1-infizierte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen ($n = 2$); Fehlerbalken: Standardabweichung

In der Gruppe der BoDV-1-infizierten Astrozyten aus **TNF-tg/tg-Mäusen** führte die **TNF-Behandlung** zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte um bis zu ca. 31 % (Abb. 57, blau).

Die alleinige Behandlung mit 5 mM **Glutamat** führte zu einer Erhöhung der optischen Dichte um knapp 18 % und die Behandlung mit 50 mM Glutamat zu einer dezenten Erhöhung der optischen Dichte um ca. 6 % (Abb. 57, gelb) im Vergleich zur optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

Die **kombinierte Behandlung** mit TNF und Glutamat führte in allen Dosiskombinationen zu einer vergleichbaren Erhöhung der optischen Dichte um bis zu knapp 15 % (Abb. 57, grün und braun), was vergleichbar mit dem Ergebnis der alleinigen Behandlung mit 5 mM Glutamat war und zeigt, dass Glutamat den dosisabhängigen TNF-Effekt aufhebt.

ERGEBNISSE

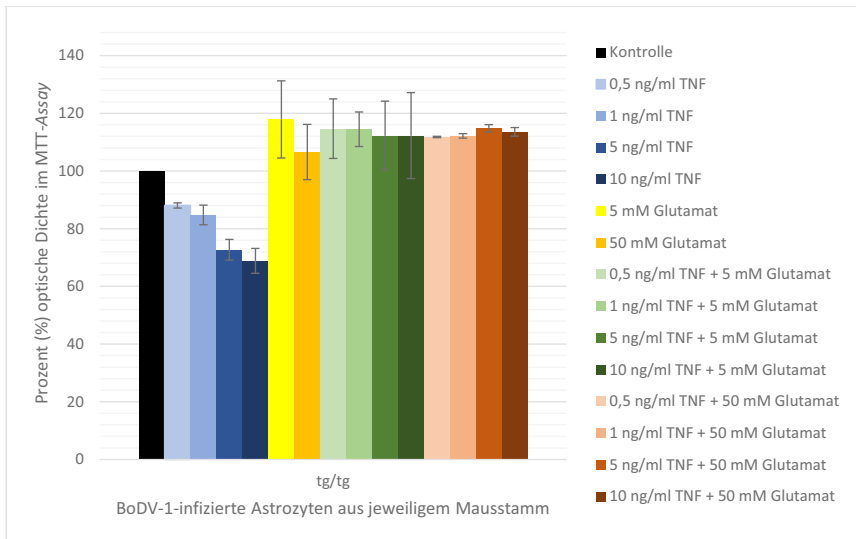


Abb. 57: Ergebnis des MTT-Assays von BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; tg/tg: homozygot TNF-transgen; Kontrolle: unbehandelte BoDV-1-infizierte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 2); Fehlerbalken: Standardabweichung

In der Gruppe der BoDV-1-infizierten Astrozyten aus **TNFR1ko-Mäusen** hatte die **TNF-Behandlung** (Abb. 58, blau), anders als bei den Astrozyten aus den anderen Mausstämmen, keinen Effekt, die optische Dichte war vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

Die alleinige Behandlung mit **Glutamat** (Abb. 58, gelb) führte ebenfalls zu einer vergleichbaren optischen Dichte mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen und hatte somit keinen Effekt.

Gleiches gilt für die **kombinierte Behandlung** von allen TNF-Dosen mit 5 mM Glutamat (Abb. 58, grün). Die kombinierte Behandlung von TNF mit 50 mM Glutamat (Abb. 58, braun) führte zu einer geringgradigen Erhöhung der optischen Dichte um bis zu ca. 13 %, unabhängig von der TNF-Dosis.

ERGEBNISSE

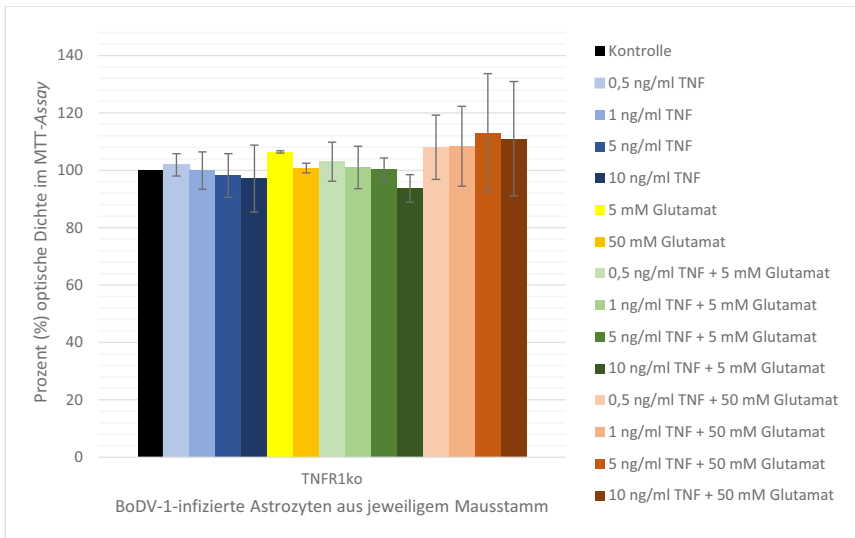


Abb. 58: Ergebnis des MTT-Assays von BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; Kontrolle: unbehandelte BoDV-1-infizierte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 2); Fehlerbalken: Standardabweichung

In der Gruppe der BoDV-1-infizierten Astrozyten aus **TNFR2ko-Mäusen** führte die **TNF-Behandlung** zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte um bis zu ca. 23 % (Abb. 59, blau).

Die alleinige Behandlung mit **Glutamat** führte mit der Dosierung 5 mM zu einer deutlichen Erhöhung der optischen Dichte um ca. 24 % und in der Dosierung 50 mM zu einer dezenten Erhöhung der optischen Dichte um ca. 8 % (Abb. 59, gelb) im Vergleich zur optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

Die **kombinierte Behandlung** mit TNF und 5 mM Glutamat (Abb. 59, grün) führte tendenziell zu einer Erhöhung der optischen Dichte, im Fall von 0,5 ng/ml TNF mit 5 mM Glutamat um ca. 12 %. Die kombinierte Behandlung von TNF mit 50 mM Glutamat (Abb. 59, braun) führte zu einer vergleichbaren optischen Dichte mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen. Insgesamt zeigt dies, dass Glutamat den dosisabhängigen TNF-Effekt aufhebt.

ERGEBNISSE

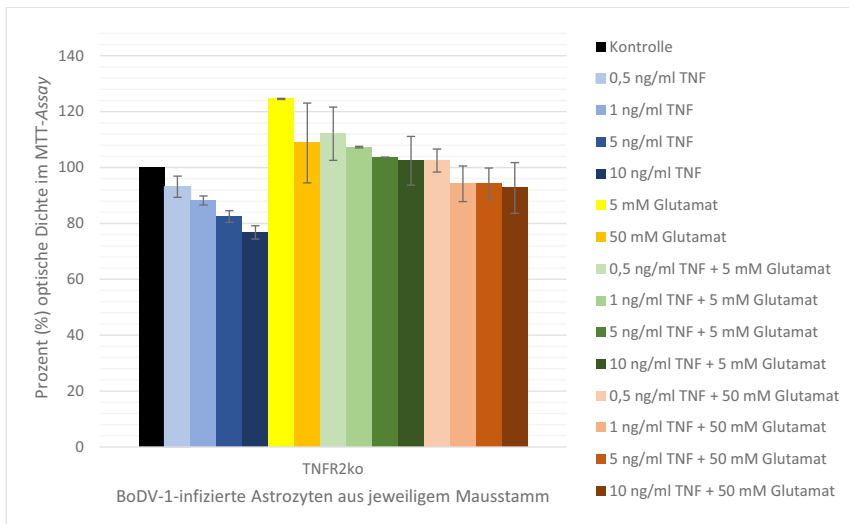


Abb. 59: Ergebnis des MTT-Assays von BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; Kontrolle: unbehandelte BoDV-1-infizierte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 2); Fehlerbalken: Standardabweichung

Insgesamt betrachtet führte **TNF** (Abb. 56-60, blau) bei BoDV-1-infizierten Astrozyten aus allen Mausstämmen, bis auf diejenigen aus TNFR1ko-Mäusen, zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte im MTT-Assay, wobei der Effekt bei Astrozyten aus wt-, TNF-tg/tg- und TNFR2ko-Mäusen vergleichbar deutlich ausgeprägt war (Verminderung um bis zu 20 – 31 %). Bei Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen hatte die TNF-Behandlung so gut wie keinen Effekt, denn die optische Dichte im MTT-Assay war vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten BoDV-1-infizierten Astrozyten.

Glutamat (Abb. 56-60, gelb) führte bei BoDV-1-infizierten Astrozyten aus allen Mausstämmen, mit Ausnahme von Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen, zu einer deutlichen Zunahme der optischen Dichte, insbesondere nach der Behandlung mit 5 mM Glutamat (Zunahme um 15 – 25 %). Bei Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen hatte die Glutamat-Behandlung nahezu keinen Effekt, die optische Dichte war vergleichbar mit der der unbehandelten Kontrollen.

Durch die **kombinierte Behandlung** mit TNF und Glutamat (Abb. 56-60, grün und braun) kam es in den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-, TNF-tg/tg- und TNFR2ko-Mäusen zur Aufhebung des alleinigen TNF-Effekts, welcher mit einer dosisabhängigen Verminderung der

optischen Dichte einherging, wobei es bei Astrozyten aus wt- und TNF-tg/tg-Mäusen sogar zu einer deutlichen, weder TNF- noch Glutamatdosis-abhängigen Zunahme der optischen Dichte um bis zu 18 – 20 % kam. Bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen kam es vor allem in den Kombinationen mit 50 mM Glutamat zu einer geringgradigen Zunahme der optischen Dichte (um bis zu 13 %), dagegen war diese bei den gleichartig behandelten BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen.

Die Effekte der verschiedenen BoDV-1-infizierten Astrozyten- und Behandlungsgruppen sind insgesamt in Abbildung 60 gegenübergestellt (siehe auch Anhang 8.4.2. und 8.4.3.).

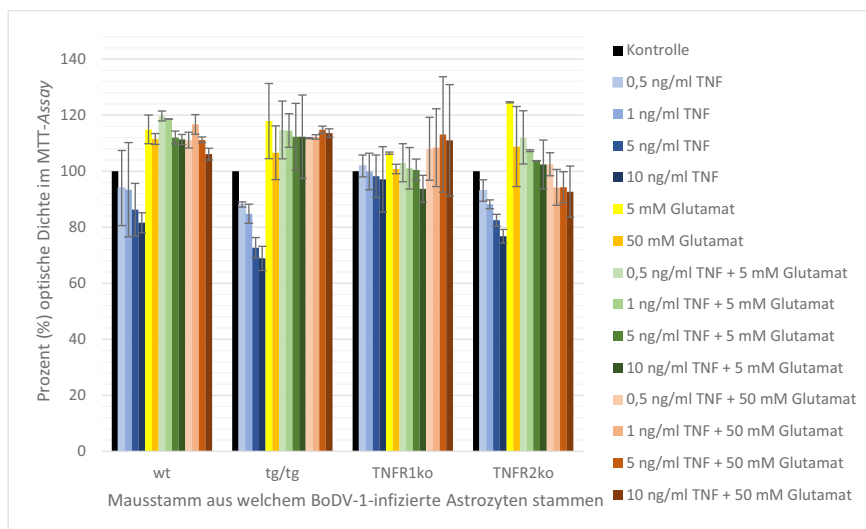


Abb. 60: Übersicht Ergebnis des MTT-Assays von BoDV-1-infizierten Astrozyten aus allen untersuchten Mausstämmen nach TNF-, Glutamat-, bzw. TNF- und Glutamatbehandlung

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; wt: Wildtyp; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; Kontrolle: unbehandelte BoDV-1-infizierte Astrozyten; Balken: arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) der Präparationen (n = 2); Fehlerbalken: Standardabweichung

4.2.1.3. Vergleich nicht infizierter und BoDV-1-infizierter Astrozyten

In der Gruppe der Astrozyten aus **wt-Mäusen** zeigten sich Unterschiede zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten in allen Behandlungsgruppen (TNF-, Glutamat- und Kombinationsbehandlungen; Abb. 51 und 56).

Die **TNF-Behandlung** führte sowohl bei den nicht infizierten, als auch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte, welche jedoch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten nicht so ausgeprägt war (ca. 18 % Verminderung nach höchster TNF-Dosis; Abb. 56, blau) im Vergleich zu den nicht infizierten Astrozyten (ca. 30 % Verminderung nach höchster TNF-Dosis; Abb. 51, blau).

Die **Glutamatbehandlung** führte hingegen bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten zu einer Erhöhung der optischen Dichte (um ca. 12 – 15 %; Abb. 56, gelb), während bei den nicht infizierten Astrozyten zumindest die Behandlung mit 5 mM Glutamat zu einer Erniedrigung der optischen Dichte (um ca. 13 %) im MTT-Assay geführt hat (Abb. 51, gelb).

Die **kombinierte Behandlung** mit TNF und Glutamat führte bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten durchweg zu einer Erhöhung der optischen Dichte (um ca. 6 – 20 %; Abb. 56, grün und braun) im Gegensatz zu den nicht infizierten Astrozyten, deren optische Dichte vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen war bzw. in Kombination mit 0,5 ng/ml TNF eine Verminderung der optischen Dichte (um ca. 13 %) erbrachte (Abb. 51, grün und braun).

Insgesamt hatten also die BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen eine höhere optische Dichte als die gleichartig behandelten nicht infizierten Astrozyten.

In der Gruppe der Astrozyten aus **TNF-tg/tg-Mäusen** zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten, jedoch nur nach den Glutamat- und Kombinationsbehandlungen (Abb. 52 und 57).

Bei der **TNF-Behandlung** zeigten sich keine Unterschiede zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen, sie führte in beiden Fällen zu einer vergleichbaren dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte (um ca. 31 – 33 % nach höchster TNF-Dosis; Abb. 52 und 57, blau).

Die **Glutamatbehandlung** führte bei BoDV-1-infizierten Astrozyten zu einer Erhöhung der optischen Dichte (um ca. 7 – 18 %; Abb. 57, gelb), wohingegen die optische Dichte bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach Glutamatbehandlung vergleichbar war mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen (Abb. 52, gelb).

In der **kombinierten Behandlung** mit TNF und Glutamat zeigten sich ebenfalls Unterschiede. Hier zeigten die BoDV-1-infizierten Astrozyten durchweg eine Erhöhung der optischen Dichte (um ca. 12 – 15 %; Abb. 57, grün und braun), wohingegen bei den nicht infizierten Astrozyten durchweg eine Verminderung der optischen Dichte (um ca. 10 – 21 %) vorlag (Abb. 52, grün und braun).

Insgesamt hatten also die BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen eine höhere optische Dichte als die gleichartig behandelten nicht infizierten Astrozyten, abgesehen nach alleiniger TNF-Behandlung, wo kein Unterschied zu finden war.

In der Gruppe der Astrozyten aus **TNFR1ko-Mäusen** fanden sich Unterschiede zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten nach den TNF- und Kombinationsbehandlungen (Abb. 53 und 58).

Die **TNF-Behandlung** führte bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen zu einer geringgradigen dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte (um ca. 11 % nach höchster TNF-Dosis; Abb. 53, blau), wohingegen die optische Dichte der BoDV-1-infizierten TNF-behandelten Astrozyten durchweg vergleichbar mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen war (Abb. 58, blau).

Bei der **Glutamatbehandlung** zeigten sich keine Unterschiede, sowohl die nicht infizierten als auch die BoDV-1-infizierten Astrozyten hatten eine vergleichbare optische Dichte mit der optischen Dichte der jeweils unbehandelten Kontrollen (Abb. 53 und 58, gelb).

Nach der **kombinierten Behandlung** mit TNF und Glutamat zeigten die nicht infizierten Astrozyten teils keine Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollen und teils eine geringgradige Verminderung der optischen Dichte (um maximal ca. 10 %; Abb. 53, grün und braun). Im Gegensatz dazu zeigten die BoDV-1-infizierten Astrozyten insbesondere in Kombination mit 50 mM Glutamat eine Erhöhung der optischen Dichte (um ca. 8 – 13 %; Abb. 58, braun).

Insgesamt hatten also die BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen in der Regel eine höhere optische Dichte als die gleichartig behandelten nicht infizierten Astrozyten, abgesehen nach alleiniger Glutamatbehandlung, wo kein Unterschied zu finden war. Auch nach kombinierter Behandlung mit TNF und 5 mM fanden sich keine deutlichen Unterschiede.

In der Gruppe der Astrozyten aus **TNFR2ko-Mäusen** fanden sich Unterschiede zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten in allen Behandlungsgruppen (TNF-, Glutamat- und Kombinationsbehandlungen; Abb. 54 und 59).

Die **TNF-Behandlung** führte sowohl bei den nicht infizierten als auch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen zu einer dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte, welche jedoch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten nicht so ausgeprägt war (ca. 23 % nach höchster TNF-Dosis; Abb. 59, blau) im Vergleich zu den nicht infizierten Astrozyten (ca. 32 % nach höchster TNF-Dosis; Abb. 54, blau).

Die **Glutamatbehandlung** führte bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen zu einer Erhöhung der optischen Dichte (um ca. 9 – 25 %; Abb. 59, gelb), wohingegen die nicht infizierten Astrozyten eine nahezu vergleichbare optische Dichte mit der optischen Dichte der unbehandelten Kontrollen aufwiesen (Abb. 54, gelb).

Bei der **kombinierten Behandlung** zeigten die nicht infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen teils eine Erhöhung der optischen Dichte (um ca. 8 – 24 %) und teils eine vergleichbare optische Dichte mit der optischen Dichte der entsprechenden unbehandelten

Kontrollen (Abb. 54, grün und braun). Die BoDV-1-infizierten Astrozyten zeigten mehrheitlich eine vergleichbare optische Dichte mit der optischen Dichte der entsprechenden unbehandelten Kontrollen, einzelne Kombinationen führten jedoch auch zu einer teils Erhöhung (um bis zu ca. 12 %) und teils geringgradigen Verminderung (um ca. 7 %) der optischen Dichte (Abb. 59, grün und braun).

Insgesamt hatten die BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen eine höhere optische Dichte als die nicht infizierten Astrozyten in den Einzelbehandlungen mit TNF und Glutamat. In der kombinierten Behandlung verhielten sich die nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten bereits innerhalb ihrer Gruppe unterschiedlich in Abhängigkeit von der Dosierungskombination, sodass mal die nicht infizierten und mal die BoDV-1-infizierten Astrozyten im Vergleich die höhere optische Dichte nach gleichartiger Behandlung aufwiesen.

4.2.1.4. Statistische Auswertung des MTT-Assays

Bezüglich der Effekte im MTT-Assay konnte im globalen Vergleich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,0012$) zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten gefunden werden (Tabelle 21). Insgesamt zeigten die BoDV-1-infizierten Astrozyten durchschnittlich eine höhere optische Dichte als die nicht infizierten Astrozyten (Abb. 55 und 60). Weiterhin lagen statistisch hochsignifikante Unterschiede zwischen den Glutamat- bzw. TNF-behandelten Astrozyten im Vergleich zu ihren jeweiligen unbehandelten Kontrollen vor ($p \leq 0,0001$). Glutamat-behandelte (vor allem BoDV-1-infizierte) Astrozyten hatten insgesamt eine höhere optische Dichte als unbehandelte Astrozyten. TNF-behandelte Astrozyten hatten insgesamt eine geringere optische Dichte als unbehandelte Astrozyten. Bezüglich TNF-Behandlung und BoDV-1-Infektion ($p = 0,049$) sowie bezüglich Glutamatbehandlung und Mausstamm ($p = 0,0071$) lagen außerdem statistisch signifikante Zweifachwechselwirkungen und bezüglich TNF- und Glutamatbehandlung eine statistisch hochsignifikante Zweifachwechselwirkung ($p < 0,0001$) vor (Tabelle 21). So war die optische Dichte von BoDV-1-infizierten TNF-behandelten Astrozyten insgesamt geringer als die optische Dichte von nicht infizierten TNF-behandelten Astrozyten. Abhängig vom Mausstamm waren die Veränderungen der optischen Dichte nach Glutamatbehandlung unterschiedlich, mit einer teils Erhöhung und teils Verminderung der optischen Dichte. Die TNF- und Glutamat-behandelten Astrozyten wiesen insgesamt eine höhere optische Dichte als die nur mit TNF behandelten Astrozyten auf. Weiterhin lagen bezüglich Glutamatbehandlung, Mausstamm und BoDV-1-Infektion ($p = 0,018$) sowie bezüglich Glutamatbehandlung, TNF-Behandlung und BoDV-1-Infektion ($p = 0,0011$) statistisch signifikante Dreifachwechselwirkungen vor (Tabelle 21). So zeigten z.B. die Glutamat-behandelten nicht infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen eher eine Verminderung der optischen Dichte, hingegen die Glutamat-behandelten BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen eine Erhöhung der optischen Dichte. Ebenfalls führte die Glutamat-

und TNF-Behandlung von BoDV-1-infizierten Astrozyten zu einer deutlich höheren optischen Dichte im Vergleich zu nicht infizierten Astrozyten.

Tabelle 21: Vierfaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung des Einflusses von Mausstamm, BoDV-1-Infektion, Glutamat und TNF auf das Verhalten von Astrozyten im MTT-Assay

Haupteffekte (p-Wert)				Zweifachwechselwirkungen (p-Wert)					
Stamm	BoDV-1	Glut.	TNF	Stamm + BoDV-1	Glut. + Stamm	Glut. + BoDV-1	TNF + Stamm	TNF + BoDV-1	Glut. + TNF
0,43	0,0012	< 0,0001	< 0,0001	0,16	0,0071	0,069	0,62	0,049	< 0,0001
Dreifachwechselwirkungen (p-Wert)				Vierfachwechselwirkungen (p-Wert)					
Glut. + Stamm + BoDV-1	TNF + Stamm + BoDV-1	Glut. + TNF + Stamm	Glut. + TNF + BoDV-1	Glut.+ TNF + Stamm + BoDV-1					
0,018	0,1	0,15	0,0011	0,33					

p-Wert: *probability*; BoDV-1: *Borna disease virus* 1-infiziert; Glut.: Glutamat; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; beige unterlegte Felder: signifikante Unterschiede

4.2.2. Immunfluoreszenz-Ergebnisse

Der Nachweis von BoDV-N und GFAP wurde bei Astrozyten aus allen Mausstämmen und Infektionsgruppen durchgeführt. Immunfluoreszenz-Untersuchungen zum Nachweis von GLT1, aktivierter Caspase 3, AIF, LC3 A/B, TNFR1, TNFR2 und PCNA wurden lediglich exemplarisch bei Astrozyten aus einzelnen Mausstämmen und Infektionsgruppen als Ergänzung zu den Ergebnissen des MTT-Assays durchgeführt (siehe Tabelle 11, 3.2.5.).

4.2.2.1. Nachweis des BoDV-1-Nukleoproteins (BoDV-N) und des *glial fibrillary acidic proteins* (GFAP)

Die Untersuchung zum Nachweis von BoDV-N diente der Kontrolle der BoDV-1-Infektion (siehe auch 3.2.5.3.). Zum Zeitpunkt der Untersuchung nach der ersten Passage (8-12 DIV bzw. 6-10 dpi) zeigten im Mittel 2,4 – 5 % der Astrozyten (Abb. 61, orange) ein vor allem im Nukleus zu findendes punktförmiges bis granuläres, sowie zum Teil ein im Zytoplasma zu findendes granuläres bis diffuses BoDV-N-Signal (Abb. 62), wobei die BoDV-1-infizierten Astrozyten meist in kleinen Gruppen nebeneinander lagen (siehe auch Anhang 8.4.4.).

Die zeitgleiche Untersuchung zum Nachweis von GFAP-positiven Astrozyten, welche ein diffuses Zytoplasmasignal zeigten (Abb. 63), diente zur Kontrolle der Reinheit der Astrozytenkultur, welche bei allen Astrozyten im Mittel zwischen 96 und 98 % lag (Abb. 61, blau; siehe auch 3.2.5.3. und Anhang 8.4.4.).

Morphologisch fanden sich zwischen den BoDV-1-infizierten und nicht infizierten Astrozyten sowie zwischen Astrozyten aus wt-Mäusen im Vergleich zu Astrozyten aus TNF-tg/tg-,

TNFR1ko- oder TNFR2ko-Mäusen keine Unterschiede. Insbesondere fanden sich auch keine Hinweise auf degeneriert erscheinende vergrößerte Zellkerne mit Kernwandhyperchromasie, wie sie in den *in vivo* Untersuchungen beschrieben sind (Abb. 63, siehe auch 4.1.2.2. und 4.1.3.2.).

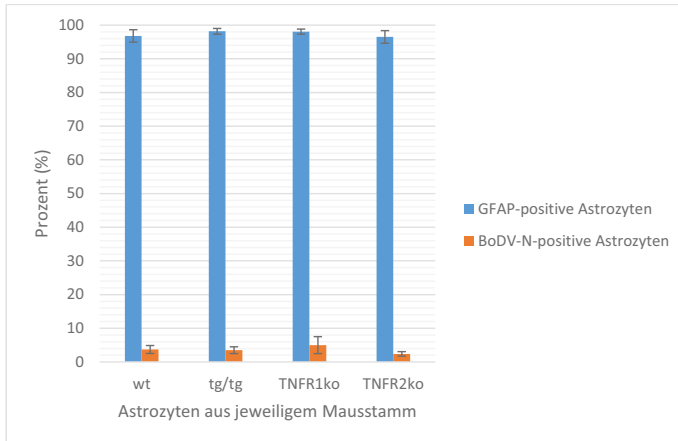


Abb. 61: Anteil GFAP-positiver bzw. BoDV-N-positiver Astrozyten 8 – 12 DIV (entspricht 6 – 10 dpi)

wt: Wildtyp; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; BoDV-N: *Borna disease virus* 1 Nukleoprotein; DIV: *days in vitro*; dpi: *days post infection*

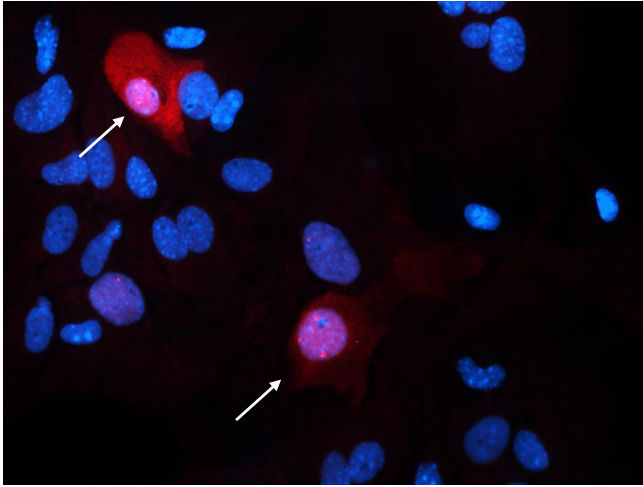


Abb. 62: Immunfluoreszenz zum Nachweis BoDV-1-infizierter Astrozyten aus wt-Mäusen 7 dpi

BoDV-1-infizierte Astrozyten zeigten mit 7 dpi ein punktförmiges bis granuläres Signal im Nukleus und zum Teil auch im Zytoplasma (Pfeile).
Gesamtvergrößerung: 400x

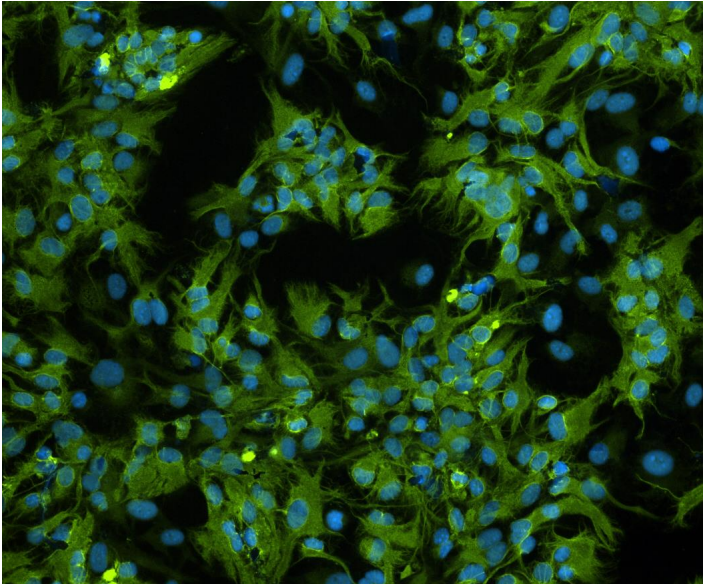


Abb. 63: Immunfluoreszenz zum Nachweis GFAP-positiver Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen 7 dpi

BoDV-1-infizierte TNF-tg/tg-Astrozyten hatten ein diffuses GFAP-Signal im Zytoplasma mit 7 dpi und zeigten keine degeneriert erscheinenden Zellkerne und keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zu nicht infizierten Astrozyten oder Astrozyten aus anderen Mausstämmen.

Gesamtvergrößerung: 200x

4.2.2.2. Nachweis des Glutamattransports 1 (GLT1)

Zur Feststellung inwiefern der Glutamattransporter 1 auf- oder abreguliert wird infolge einer Glutamat- und/oder TNF-Behandlung wurden exemplarisch in der nicht infizierten Gruppe unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen 8 – 12 DIV untersucht, da wir hier die größten Auswirkungen bzw. Unterschiede in der Expression erwartet haben (Abb. 64; siehe auch 3.2.5.3.).

GLT1-positive Astrozyten zeigten ein körniges bis fein punktförmiges Signal im Zytoplasma und in der Zellmembran (Abb. 65).

Im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten von welchen durchschnittlich 38 % eine GLT1-Expression zeigten (Abb. 64, grau), kam es bei mit 5 mM Glutamat behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen zu einer mittelgradigen GLT1-Aufregulation auf 54 % (Abb. 64, gelb). TNF- bzw. Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen zeigten nur eine

ERGEBNISSE

geringgradige GLT1-Aufregulation auf durchschnittlich 47 % (Abb. 64, blau und grün) im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten.

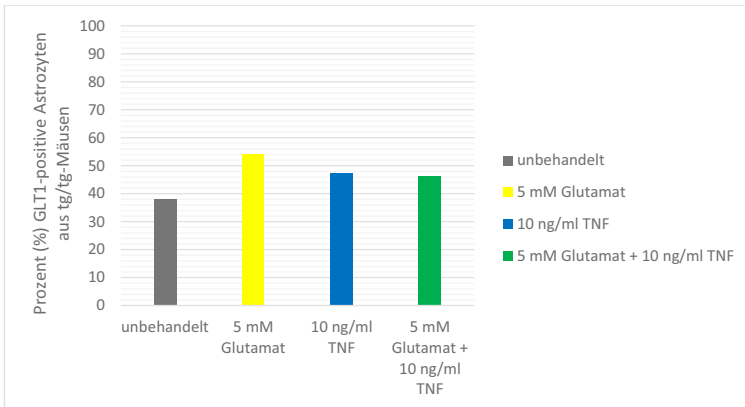


Abb. 64: Nachweis von GLT1 bei Glutamat- und/oder TNF-behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen 8 – 12 DIV

GLT1: Glutamattransporter 1; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; tg/tg: homozygot TNF-transgen; DIV: days *in vitro*

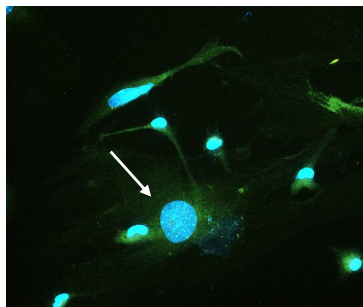


Abb. 65: Immunfluoreszenz zum Nachweis von GLT1 in unbehandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen

GLT1-positive Astrozyten zeigten ein fein punktförmiges Signal im Zytoplasma und in der Zellmembran (Pfeil).

Gesamtvergrößerung: 200x

4.2.2.3. Nachweis von Apoptose, des PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods und von Autophagie

Zur Überprüfung verschiedener Zelluntergänge wurden drei verschiedene Marker eingesetzt. Aktivierte Caspase 3 zum Nachweis des klassischen Caspase-abhängigen Apoptoseweges,

AIF zum Nachweis des Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods und LC3 A/B zum Nachweis von Autophagie.

4.2.2.3.1. Nachweis von aktivierter Caspase 3

Exemplarisch wurden in der nicht infizierten Gruppe unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg- und TNFR1ko-Mäusen zum Nachweis von aktivierter Caspase 3 untersucht, da wir bei den TNF-tg/tg-Mäusen die deutlichsten und bei den TNFR1ko-Mäusen die geringsten Auswirkungen bezüglich des Vorliegens von Zelltod in Anlehnung an die Ergebnisse des MTT-Assays vermutet haben (Abb. 66-67; siehe auch 3.2.5.3. und 4.2.1.1.).

In der BoDV-1-infizierten Gruppe wurden exemplarisch unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus wt-Mäusen untersucht (Abb. 68), da hier im MTT-Assay nach TNF-Behandlung eine dosisabhängige Verminderung der optischen Dichte festzustellen war, im Gegensatz dazu aber eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte nach Glutamat- sowie Glutamat- und TNF-Behandlung zu sehen war, was auf eine unterschiedliche Apoptoserate zurückzuführen sein könnte (siehe auch 4.2.1.2.).

Caspase 3-positive Astrozyten zeigten ein scholliges Signal im Zytoplasma (Abb. 69).

Weder bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg- und TNFR1ko-Mäusen (Abb. 66-67), noch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen (Abb. 68) kam es durch Glutamat- und/oder TNF-Behandlung zu einer deutlichen Zunahme Caspase 3-positiver Zellen (Abb. 69), als Nachweis von Apoptose, im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten. Die Menge der Caspase 3-positiven Astrozyten lag bei den unbehandelten Kontrollen < 1 % (Abb. 66-68, grau) und überschritt in keiner Behandlungs-, Infektions- oder Tiergruppe 2 % der Astrozyten (Abb. 66-68, gelb, blau und grün).

ERGEBNISSE

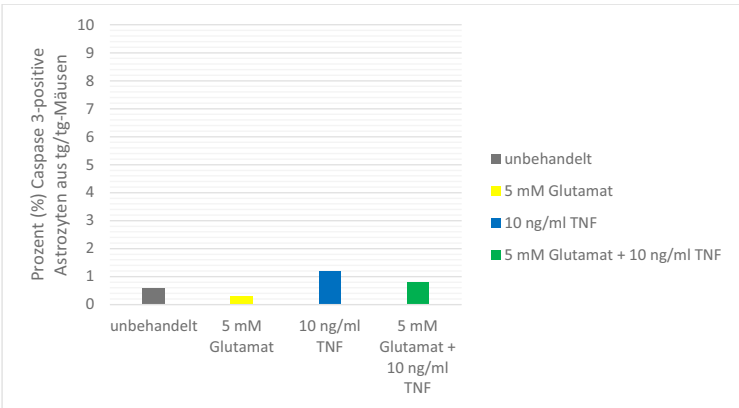


Abb. 66: Anteil Caspase 3-positiver Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV
TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; tg/tg: homozygot TNF-transgen; DIV: *days in vitro*

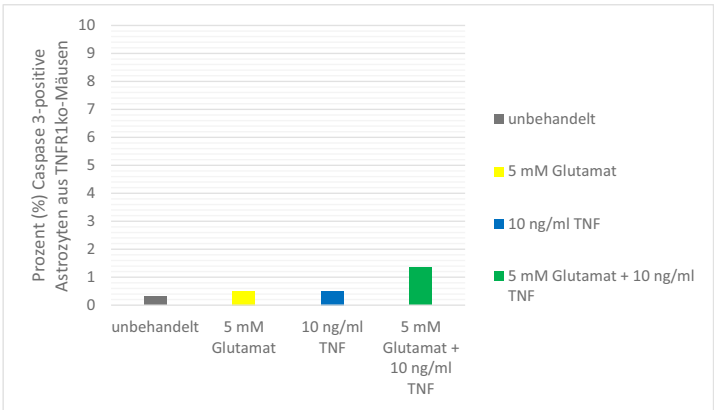


Abb. 67: Anteil Caspase 3-positiver Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV
TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; DIV: *days in vitro*

ERGEBNISSE

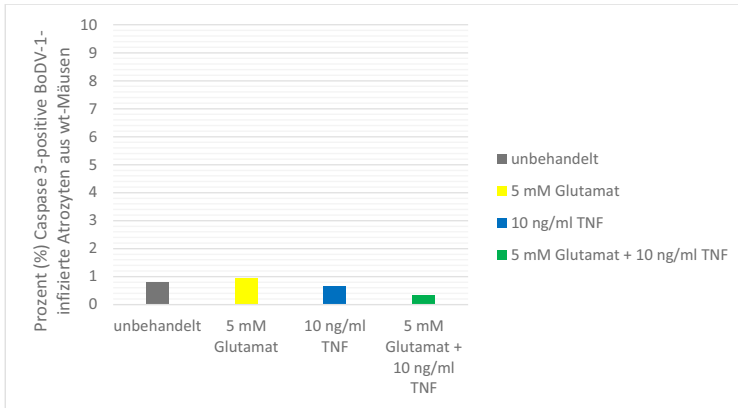


Abb. 68: Anteil Caspase 3-positiver BoDV-1-infizierter Astrozyten aus wt-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

BoDV-1: *Borna disease virus 1*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; wt: Wildtyp; DIV: *days in vitro*

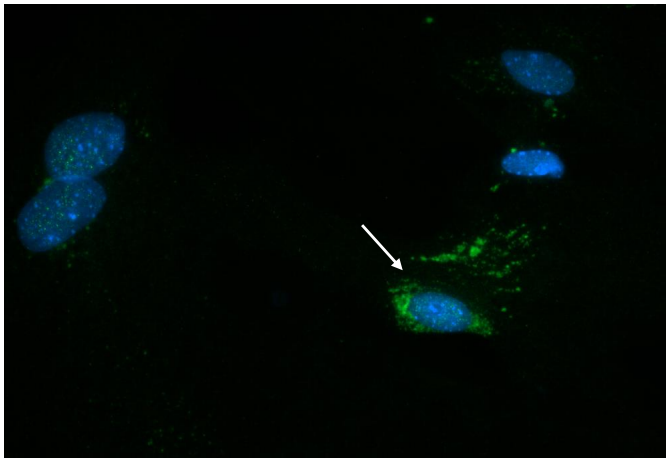


Abb. 69: Immunfluoreszenz zum Nachweis von aktivierter Caspase 3 in Glutamat- und TNF-behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg Mäusen

Caspase 3-positiver Astrozyt mit scholligem Zytoplasmasignal (Pfeil).

Gesamtvergrößerung: 400x

4.2.2.3.2. Nachweis des *apoptosis inducing factors* (AIF)

Exemplarisch wurden in der nicht infizierten Gruppe unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg- und TNFR1ko-Mäusen zum Nachweis von nukleärer Translokation von AIF untersucht, da wir bei den TNF-tg/tg-Mäusen die deutlichsten und bei den TNFR1ko-Mäusen die geringsten

Auswirkungen bezüglich des Vorliegens von Zelltod in Anlehnung an die Ergebnisse des MTT-Assays vermutet haben (Abb. 70-71; siehe auch 3.2.5.3. und 4.2.1.1.).

In der BoDV-1-infizierten Gruppe wurden exemplarisch unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus wt-Mäusen untersucht (Abb. 72), da hier im MTT-Assay nach TNF-Behandlung eine dosisabhängige Verminderung der optischen Dichte festzustellen war, im Gegensatz dazu aber eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte nach Glutamat- sowie Glutamat- und TNF-Behandlung zu sehen war, was auf eine unterschiedliche Zelltodrate zurückzuführen sein könnte (siehe auch 4.2.1.2.).

AIF-positive Astrozyten zeigten ein körniges bis fein punktförmiges Signal im Zellkern oder im Zellkern und Zytoplasma (Abb. 73).

Weder bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg- und TNFR1ko-Mäusen (Abb. 70-71), noch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen (Abb. 72) kam es durch Glutamat- und/oder TNF-Behandlung zu einer deutlichen Zunahme AIF-positiver Zellen (Abb. 73), als Nachweis des Caspase 3-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods, im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten. Die Menge der AIF-positiven Astrozyten lag bei den unbehandelten Kontrollen zwischen < 1 % (Abb. 70-72, grau) und zeigte lediglich bei den BoDV-1-infizierten und TNF-behandelten Astrozyten aus wt-Mäusen eine geringe Zunahme auf knapp über 2 % AIF-positive Zellen (Abb. 72, blau). Alle anderen Behandlungs-, Infektions- bzw. Mausgruppen der Astrozyten waren vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen und lagen < 1 % (Abb. 70-72).

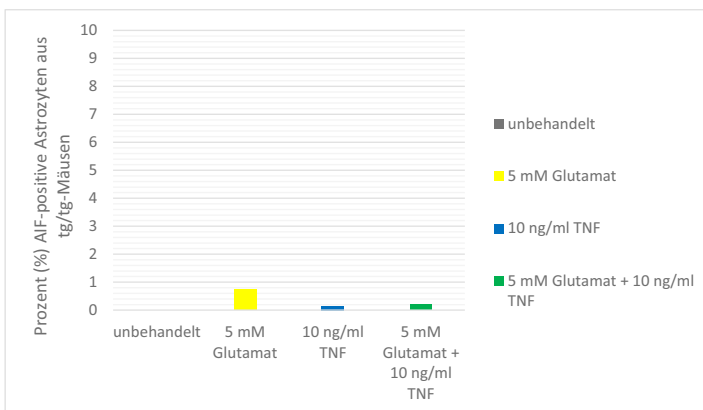


Abb. 70: Anteil AIF-positiver Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

AIF: *apoptosis inducing factor*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; tg/tg: homozygot TNF-transgen; DIV: *days in vitro*

ERGEBNISSE

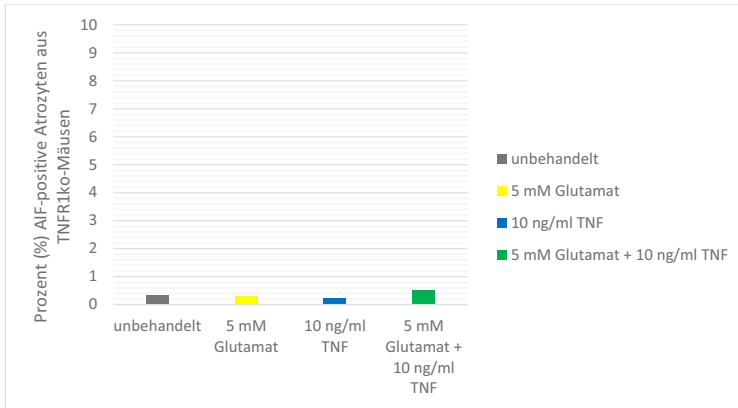


Abb. 71: Anteil AIF-positiver Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

AIF: *apoptosis inducing factor*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; DIV: *days in vitro*

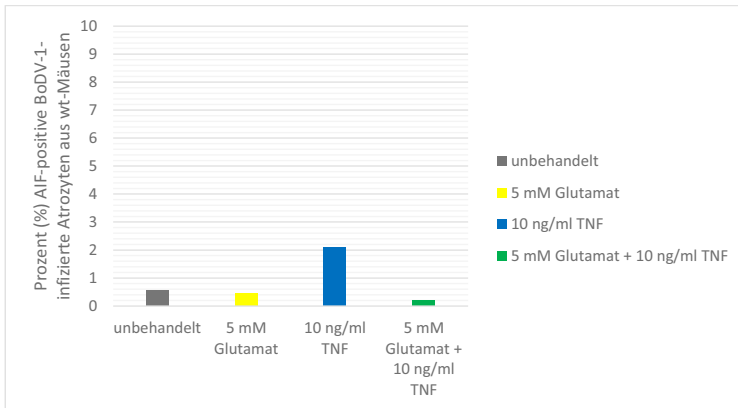


Abb. 72: Anteil AIF-positiver BoDV-1-infizierter Astrozyten aus wt-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

AIF: *apoptosis inducing factor*; BoDV-1: *Borna disease virus 1*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; wt: Wildtyp; DIV: *days in vitro*

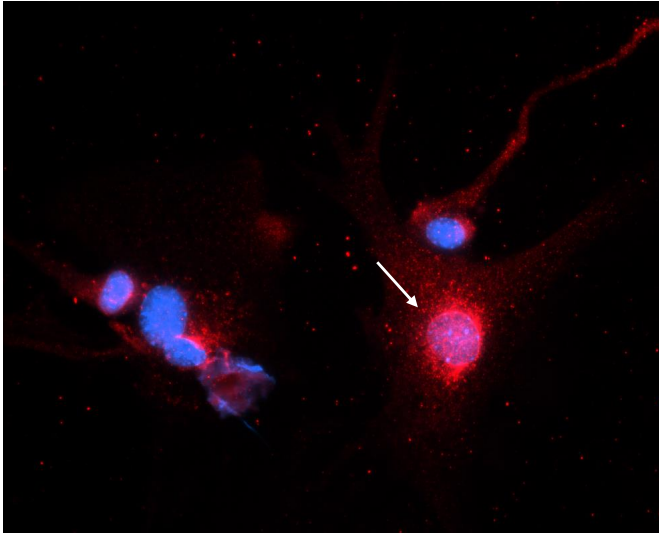


Abb. 73: Immunfluoreszenz zum Nachweis von AIF in Glutamat- und TNF-behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen

AIF-positiver Astrozyt mit fein punktförmigem Signal im Zellkern und Zytosoma (Pfeil). Gesamtvergrößerung: 400x

4.2.2.3.3. Nachweis von *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC3 A/B)

Exemplarisch wurden in der nicht infizierten Gruppe unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg- und TNFR1ko-Mäusen zum Nachweis von LC3 A/B untersucht, da wir bei den TNF-tg/tg-Mäusen die deutlichsten und bei den TNFR1ko-Mäusen die geringsten Auswirkungen bezüglich des Vorliegens von Zelltod in Anlehnung an die Ergebnisse des MTT-Assays vermutet haben (Abb. 74-75; siehe auch 3.2.5.3. und 4.2.1.1.).

In der BoDV-1-infizierten Gruppe wurden exemplarisch unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus wt-Mäusen untersucht (Abb. 76), da hier im MTT-Assay nach TNF-Behandlung eine dosisabhängige Verminderung der optischen Dichte festzustellen war, im Gegensatz dazu aber eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte nach Glutamat- sowie Glutamat- und TNF-Behandlung zu sehen war, was auf eine unterschiedliche Autophagierate zurückzuführen sein könnte (siehe auch 4.2.1.2.). LC3 A/B-positive Astrozyten zeigten ein punktförmiges Signal im Zytosoma und Zellkern (Abb. 77).

Weder bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg- und TNFR1ko-Mäusen (Abb. 74-75), noch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen (Abb. 76) kam es durch Glutamat- und/oder TNF-Behandlung zu einer deutlichen Zunahme LC3 A/B-positiver Zellen (Abb. 77), als Nachweis von Autophagie, im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten. Die Menge der LC3 A/B-positiven Astrozyten lag bei den unbehandelten Kontrollen immer $\leq 1\%$ (Abb. 74-76, grau) und zeigte lediglich bei den nicht infizierten und Glutamat-behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen eine geringe Zunahme auf knapp 3 % LC3 A/B-positive Zellen (Abb. 74, gelb). Alle anderen Behandlungs-, Infektions- bzw. Mausgruppen der Astrozyten waren vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen und lagen zwischen ca. 0,4 und 1,8 % (Abb. 74-76).

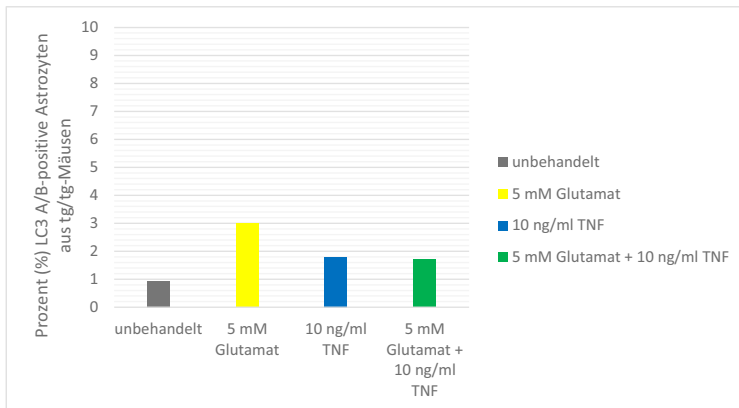


Abb. 74: Anteil LC3 A/B-positiver Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

LC3 A/B: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; tg/tg: homozygot TNF-transgen; DIV: *days in vitro*

ERGEBNISSE

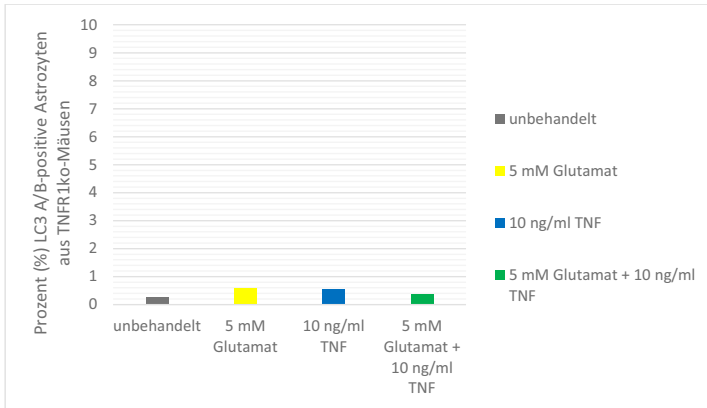


Abb. 75: Anteil LC3 A/B-positiver Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

LC3 A/B: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; DIV: *days in vitro*

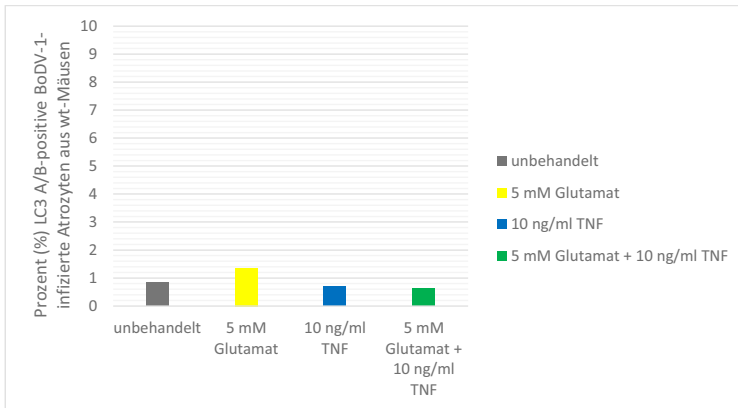


Abb. 76: Anteil LC3 A/B-positiver BoDV-1-infizierter Astrozyten aus wt-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

LC3 A/B: *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*; BoDV-1: *Borna disease virus 1*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; wt: Wildtyp; DIV: *days in vitro*

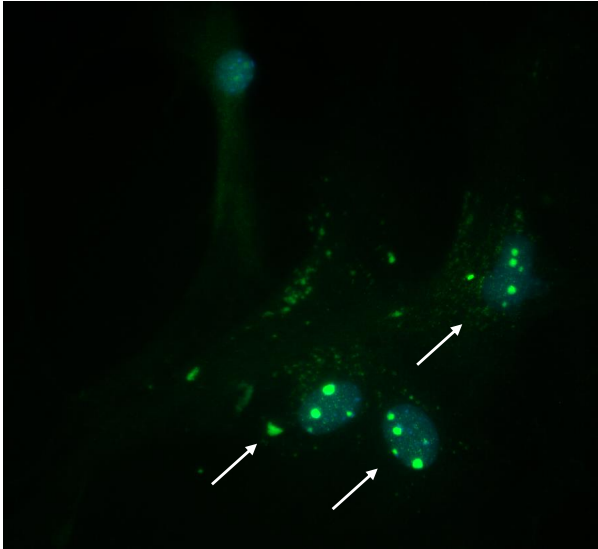


Abb. 77: Immunfluoreszenz zum Nachweis von LC3 A/B in Glutamat- und TNF-behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen

LC3 A/B-positive Astrozyten mit punktförmigem Signal im Zytoplasma und Zellkern (Pfeile). Gesamtvergrößerung: 400x

4.2.2.4. Nachweis der TNF-Rezeptoren

Zur Feststellung ob TNF-Rezeptoren bei Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen auf- oder abreguliert werden infolge von Glutamat- und/oder TNF-Behandlung, wurden die Astrozyten exemplarisch zum Nachweis von TNFR1 und TNFR2 mittels Immunfluoreszenz untersucht.

4.2.2.4.1. Nachweis des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1)

Exemplarisch wurden in der nicht infizierten Gruppe unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen zum Nachweis von TNFR1 untersucht, da wir bei den TNF-tg/tg-Mäusen die deutlichsten Auswirkungen bzw. Unterschiede in der Expression vermutet haben (Abb. 78, siehe auch 3.2.5.3.).

TNFR1-positive Astrozyten zeigten ein körniges bis fein punktförmiges Signal im Zytoplasma und in der Zellmembran (Abb. 79).

Sowohl durch eine Behandlung mit 5 mM Glutamat (Abb. 78, gelb) als auch durch 10 ng/ml TNF (Abb. 78, blau) kam es bei Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen zu einer deutlichen Aufregulation von TNFR1 mit einer mehr als Verdopplung an TNFR1-positiven Astrozyten (bis

20 %) im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen, bei welchen knapp 8 % TNFR1-positiv waren (Abb. 78, grau). Die kombinierte Behandlung mit Glutamat und TNF hatte hingegen keinen Effekt auf die TNFR1-Expression (Abb. 78, grün), der prozentuale Anteil an TNFR1-positiven Astrozyten in dieser Behandlungsgruppe war vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen (Abb. 78, grau).

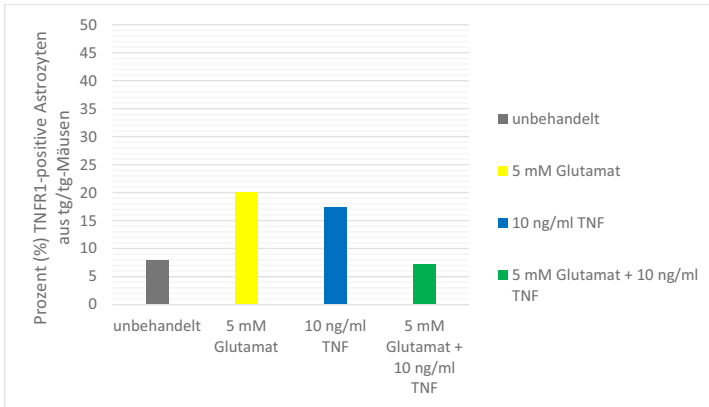


Abb. 78: Anteil TNFR1-positiver Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; TNFR1: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1; tg/tg: homozygot TNF-transgen; DIV: *days in vitro*

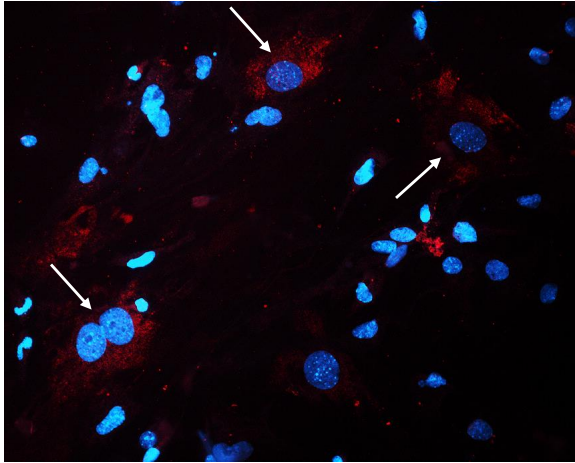


Abb. 79: Immunfluoreszenz zum Nachweis von TNFR1 in Glutamat-behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen

TNFR1-positive Astrozyten mit körnigem bis feinpunktförmigem Signal im Zytoplasma und in der Zellmembran (Pfeile).

Gesamtvergrößerung: 200x

4.2.2.4.2. Nachweis des TNF-Rezeptors 2 (TNFR2)

Exemplarisch wurden in der nicht infizierten Gruppe unbehandelte, Glutamat-behandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen zum Nachweis von TNFR2 untersucht, da wir bei den TNF-tg/tg-Mäusen die deutlichsten Auswirkungen bzw. Unterschiede in der Expression vermutet haben (Abb. 80, siehe auch 3.2.5.3.).

TNFR2-positive Astrozyten zeigten ein körniges bis feinpunktförmiges Signal im Zytoplasma und in der Zellmembran (Abb. 81).

Bei mit 5 mM Glutamat behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen kam es zu einer Aufregulation von TNFR2 mit knapp 8 % TNFR2-positiven Zellen (Abb. 80, gelb), was in etwa einer Verdopplung der TNFR2-positiven Astrozyten im Vergleich zu den unbehandelten Astrozyten mit gut 3 % TNFR2-positiven Zellen (Abb. 79 grau) entsprach. Die Behandlung mit 10 ng/ml TNF (Abb. 80, blau) sowie die kombinierte TNF- und Glutamatbehandlung (Abb. 80, grün) hatte keinen Effekt auf die TNFR2-Expression, der prozentuale Anteil an TNFR2-positiven Astrozyten in diesen Behandlungsgruppen war vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen (Abb. 80, grau).

ERGEBNISSE

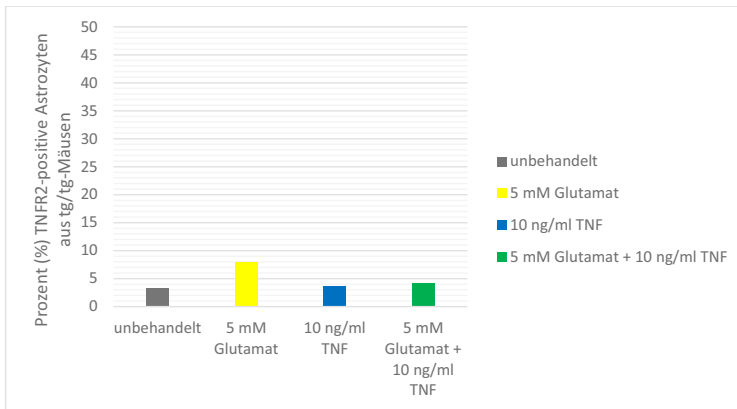


Abb. 80: Anteil TNFR2-positiver Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach Glutamat- und/oder TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; TNFR2: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2; tg/tg: homozygot TNF-transgen; DIV: *days in vitro*

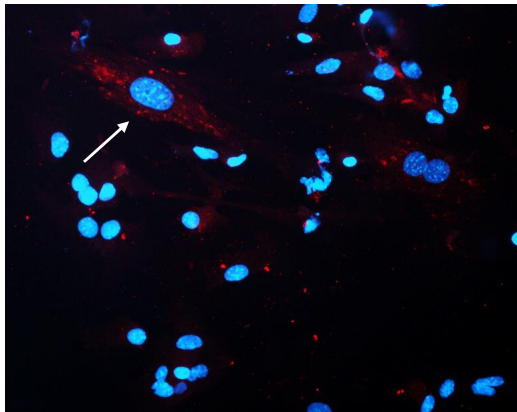


Abb. 81: Immunfluoreszenz zum Nachweis von TNFR2 in Glutamat-behandelnten Astrozyten aus tg/tg-Mäusen

TNFR2-positive Astrozyten mit körnigem bis fein punktförmigem Signal im Zytoplasma und in der Zellmembran (Pfeil).

Gesamtvergrößerung: 200x

4.2.2.5. Nachweis des *proliferating cell nuclear antigens* (PCNA)

Exemplarisch wurden in der nicht infizierten Gruppe unbehandelte, TNF-behandelte sowie Glutamat- und TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg- und wt-Mäusen hinsichtlich des Vorliegens proliferierender Zellen mittels Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA untersucht, da wir hier deutliche Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen den

verschiedenen Behandlungsgruppen in Anlehnung an die Ergebnisse des MTT-Assays vermutet haben (Abb. 82-83; siehe auch 3.2.5.3. und 4.2.1.1.).

In der BoDV-1-infizierten Gruppe wurden exemplarisch unbehandelte, Glutamat-behandelte sowie TNF-behandelte Astrozyten aus wt-Mäusen untersucht (Abb. 84), da hier im MTT-Assay nach TNF-Behandlung eine dosisabhängige Verminderung der optischen Dichte festzustellen war, im Gegensatz dazu aber eine deutliche Erhöhung der optischen Dichte nach Glutamatbehandlung zu sehen war, was auf eine unterschiedliche Proliferationsrate zurückzuführen sein könnte (siehe auch 4.2.1.2.).

PCNA-positive Astrozyten zeigten ein punktförmiges Signal im Zellkern (Abb. 85).

Bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg- und wt-Mäusen kam es durch TNF- bzw. TNF- und Glutamatbehandlung zu keiner deutlichen Zu- oder Abnahme PCNA-positiver, proliferierender Zellen, denn die PCNA-positiven Astrozyten lagen unabhängig von Behandlungs- und Tiergruppe bei knapp unter bis knapp über 1 % (Abb. 82-83, blau und grün) und waren damit vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen, bei welchen die Menge an PCNA-positiven Zellen ebenfalls bei um die 1 % lag (Abb. 82-83, grau). Bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen kam es bei alleiniger Glutamatbehandlung zu einer geringgradigen Erhöhung PCNA-positiver Astrozyten auf knapp 2 % (Abb. 84, gelb) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, welche bei etwa 0,6 % lagen (Abb. 84, grau). Bei alleiniger TNF-Behandlung der BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen kam es hingegen zu einer geringgradigen Verminderung PCNA-positiver Astrozyten, welche bei knapp 0,2 % lagen (Abb. 84, blau).

ERGEBNISSE

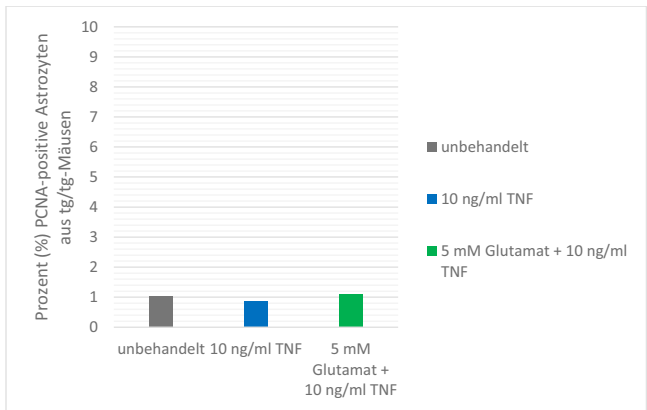


Abb. 82: Anteil PCNA-positiver proliferierender Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach TNF- bzw. TNF- und Glutamatbehandlung 8 – 12 DIV
PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; tg/tg: homozygot TNF-transgen; DIV: *days in vitro*

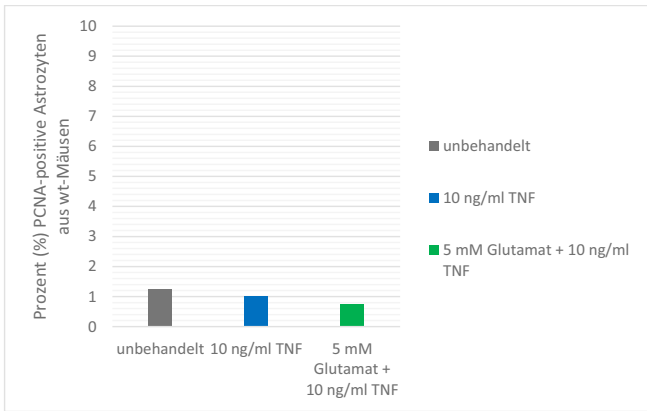


Abb. 83: Anteil PCNA-positiver proliferierender Astrozyten aus wt-Mäusen nach TNF- bzw. TNF- und Glutamatbehandlung 8 – 12 DIV
PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*; TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; wt: Wildtyp; DIV: *days in vitro*

ERGEBNISSE

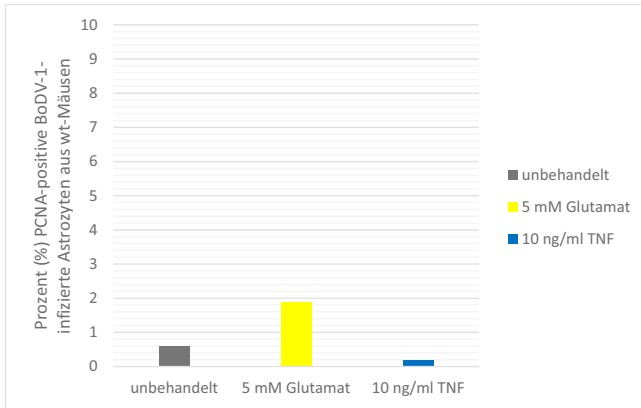


Abb. 84: Anteil PCNA-positiver proliferierender BoDV-1-infizierter Astrozyten aus wt-Mäusen nach Glutamat- bzw. TNF-Behandlung 8 – 12 DIV

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*; BoDV-1: *Borna disease virus 1*; TNF: Tumornekrose-Faktor; wt: Wildtyp; DIV: *days in vitro*

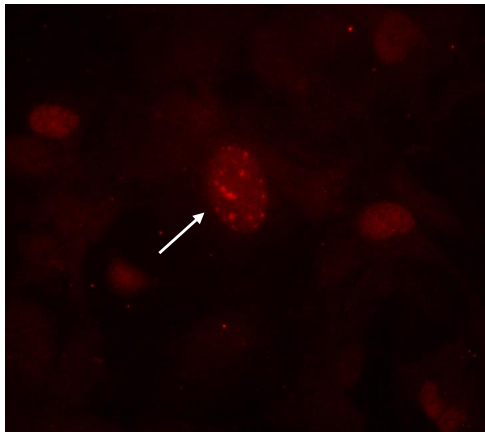


Abb. 85: Immunfluoreszenz zum Nachweis von PCNA in unbehandelten Astrozyten aus wt-Mäusen

PCNA-positive Astrozyten mit punktförmigem Signal im Zellkern (Pfeil).

Gesamtvergrößerung: 40

5. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, die astroglialen Veränderungen nach viralen Infektionen am Beispiel der BoDV-1-Infektion im Zusammenhang mit Veränderungen des TNF-Systems und damit einhergehend auch des Glutamatsystems näher zu charakterisieren. Dies diente dazu grundlegende Mechanismen bei der Pathogenese von epileptiformen Krämpfen näher zu beleuchten. Die Infektion von TNF-transgenen sowie von TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen mit dem neurotrophen BoDV-1 stellt hierzu ein geeignetes Modellsystem dar. Hierzu wurden sowohl *in vivo* Versuche mit nicht infizierten, Mock-infizierten und BoDV-1-infizierten wt-, TNF-tg/+-, TNF-tg/tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen, als auch *in vitro* Versuche mit nicht infizierten und BoDV-1-infizierten primären kortikalen Astrozytenkulturen aus den gleichen Tiergruppen durchgeführt. Letztere wurden vergleichend auch mit TNF und/oder Glutamat behandelt.

Es ist mittlerweile bekannt, dass ein enger Zusammenhang zwischen Epilepsie und Neuroinflammation besteht und dass diese sich gegenseitig in beide Richtungen bedingen können (CHOI *et al.*, 2009; Übersicht bei RAVIZZA *et al.*, 2011, VEZZANI *et al.*, 2011a und VEZZANI *et al.*, 2016a). Die Entwicklung von epileptiformen Krämpfen durch eine BoDV-1-Infektion ist bereits beschrieben, zum einen bei neonatal intrazerebral infizierten TNF-transgenen Mäusen, wie sie auch in unserer Studie angewendet werden, zum anderen auch bei adult intrazerebral infizierten Lewis-Ratten nach Naloxonbehandlung (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SOLBRIG *et al.*, 1996). Ebenfalls ist bekannt, dass Virusinfektionen des Gehirns zu reaktiver Astrogliose führen, was auch nach BoDV-1-Infektionen der Fall ist. Besonders ausgeprägte astrogliale Veränderungen mit deutlicher Hypertrophie und vergrößerten Zellkerndurchmessern treten nach BoDV-1-Infektion von TNF-transgenen Mäusen auf (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Dies wurde in der hier vorliegenden Studie reproduziert, um die morphologischen Veränderungen der Astrozyten hinsichtlich der zugrunde liegenden Pathogenese der epileptiformen Krämpfe näher zu charakterisieren und Hinweise auf eine veränderte Funktionalität zu gewinnen. Hierbei sollte insbesondere untersucht werden, ob es sich um eine ggf. alternative Form des Zelluntergangs handelt oder ob eine bisher so nicht beobachtete Form einer reaktiven Astrogliose vorliegt. Eine der vielen Aufgaben von Astrozyten ist, für ein konstantes Mikromilieu im Gehirn zu sorgen, wobei sie insbesondere überschüssiges Glutamat aus dem synaptischen Spalt über Glutamatttransporter aufnehmen um Hyperexzitabilität und Glutamatneurotoxizität zu verhindern (Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). Gleichzeitig können sie aber auch Glutamat über Ca^{2+} -vermittelte Exozytose abgeben und damit untereinander und

mit Neuronen kommunizieren und die synaptische Plastizität beeinflussen (BEZZI *et al.*, 2004; ROTHSTEIN *et al.*, 1996; Übersicht bei PAPA *et al.*, 2014). Diese Mechanismen werden auch durch TNF reguliert, da TNF die Glutamin-Synthetase und damit die Glutamataufnahme hemmt sowie die Ankopplungsgeschwindigkeit der glutamathaltigen Vesikel in Astrozyten beeinflusst (SANTELLO *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2010). Im Rahmen reaktiver Astroglieose bzw. infolge von Virusinfektionen und Neuroinflammation kann TNF stark aufreguliert werden, was wiederum zu schädlichen Effekten im Gehirn einschließlich der Entstehung epileptiformer Krämpfe führen kann (OLMOS and LLADO, 2014; SAVIN *et al.*, 2009; SRIRAM and O'CALLAGHAN, 2007; Übersicht bei PROBERT, 2015 und RAVIZZA *et al.*, 2011).

5.1. *IN VIVO* UNTERSUCHUNGEN

5.1.1. Klinische Symptome

Epileptiforme Krämpfe sind bei neonatal BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäusen ab 21 dpi (TNF-tg/tg-Mäuse) bzw. ab 42 dpi (TNF-tg/+Mäuse) beschrieben (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Zusätzlich sind bei neonatal BoDV-1-infizierten Mäusen geringere Gewichtszunahmen im Vergleich zu Mock-infizierten Tieren beschrieben, was auch in der hier vorliegenden Studie festgestellt werden konnte (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Auch bei BoDV-1-infizierten Ratten sind verminderte Gewichtszunahmen beschrieben (BAUTISTA *et al.*, 1995; HERDEN *et al.*, 2000; PLETNIKOV *et al.*, 1999). In der hier vorliegenden Studie konnte aus der Gruppe der BoDV-1-infizierten Mäuse bei einem 30 Tage alten TNFR2ko-Tier, welches zuvor klinisch unauffällig war, ein generalisierter epileptiformer Krampf mittels Videoaufzeichnungen belegt werden, woran das Tier verstarb. Der Ablauf des Krampfes war vergleichbar mit den generalisierten epileptiformen Krämpfen bei BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäusen aus vorherigen Studien und konnte ebenfalls in die Phasen Aura, Tremor, Iktus und tonische Phase unterteilt werden (KRAMER, 2006). Daneben wurden zwei weitere TNFR2ko-Mäuse im Alter von 40 und 37 Tagen tot aufgefunden, wovon Erstere zuvor keine klinischen Auffälligkeiten zeigte, jedoch nach dem Tod die typische Haltung und das Fell wie die an Krämpfen verstorbenen Tiere aufwies (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Die zweite Maus zeigte ab 35 dpi 5 – 10 % Gewichtsabweichung sowie Hyperaktivität, Schreckhaftigkeit und Aggressivität, bevor auch sie in vergleichbarer typischer Körperhaltung tot aufgefunden wurde. Die typische Körperhaltung nach dem Tod sowie die klinischen Anzeichen legen nahe, dass auch diese beiden Tiere an einem generalisierten epileptiformen Krampf gestorben sind. Videoaufzeichnungen wurden bei diesen Mäusen nicht durchgeführt. Insbesondere die gestreckte Gliedmaßenhaltung wurde bereits von Kramer bei an generalisierten epileptiformen

Krampfanfällen gestorbenen Mäusen beschrieben (KRAMER, 2006). Ähnliche Verhaltensauffälligkeiten wie bei den TNFR2ko-Mäusen sowie eine Gewichtsabweichung von 10 – 25 %, gesträubtes Fell und ein final gekrümmter Rücken, führten bei einer BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Maus zum Versuchsabbruch 29 dpi. Möglicherweise wäre auch bei dieser TNFR1ko-Maus ein epileptiformer Krampf die Folge gewesen. Es ist jedoch beschrieben, dass bei TNFR1ko-Mäusen eine verminderte Krampfanfälligkeit, vermittelt über die protektiven Wirkungen des TNFR2, vorliegt (BALOSSO *et al.*, 2005). Weder in der Gruppe der BoDV-1-infizierten TNF-transgenen, noch der wt-Mäuse, konnten generalisierte epileptiforme Krämpfe beobachtet werden. Ebenfalls wurden während der Untersuchungen und der täglichen Kontrollen keine komplex fokalen Anfälle, im Gegensatz zur Studie von Kramer, beobachtet (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Da die Dauer dieser komplex fokalen Anfälle nicht länger als 30 Sekunden betrug und nicht mit dem Tod der Tiere einherging, ist das Auftreten komplex fokaler Anfälle während unbeobachteten Zeiträumen nicht auszuschließen (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Dies könnte auch ursächlich an der geringeren Gewichtszunahme der BoDV-1-infizierten Tiere beteiligt sein. Die geringsten Gewichtszunahmen lagen bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen, im Vergleich zu den TNF-tg/+ und wt-Mäusen vor (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Weiterhin wurden auch nach einer TMEV-Infektion von Mäusen Veränderungen im Elektroenzephalogramm beobachtet, ohne dass die Tiere klinisch auffällige Krämpfe zeigten (BRÖER *et al.*, 2016).

Grund für die unterschiedliche Häufigkeit des Auftretens epileptiformer Krämpfe zwischen der Studie von Kramer und der hier vorliegenden Studie kann die unterschiedliche Verdünnung der Virussuspension sein, welche hier um Faktor 10 höher verdünnt wurde, aufgrund von vermehrten Jungtierversen nach der BoDV-1-Infektion bei Verwendung einer vergleichbaren Verdünnung wie bei Kramer (KRAMER, 2006). Auch in dem TMEV-Modell traten Krämpfe nur bei Verwendung eines speziellen Virusstamms und unter Verwendung eines höheren Virustiters auf (BRÖER *et al.*, 2016). Neurologische Symptome sind bei Mäusen nach experimenteller BoDV-1-Infektion beschrieben, variieren jedoch im Ausmaß und im Zeitpunkt des Auftretens der Symptome, abhängig vom genetischen Stamm bzw. Haplotyp (FREUDE *et al.*, 2002; HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HAUSMANN *et al.*, 1999). Die hier verwendeten C57BL/6-Mäuse sind als wenig bis mäßig empfänglich für die klinisch apparente Form der Bornaschen Erkrankung beschrieben, so zeigten in der Studie von Hallensleben *et al.* 13 % der BoDV-1-infizierten C57BL/6-Mäuse neurologische Symptome ab einem Alter von 34 – 39 Tagen (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). In der Studie von Kramer zeigten die BoDV-1-infizierten C57BL/6-Mäuse nur dezente klinische Unterschiede in verschiedenen Tests, im Vergleich zu Mock- und nicht infizierten Mäusen (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). In Abhängigkeit von der Höhe der TNF-Überexpression, kam es bei 42 % der BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäuse zu epileptiformen Krämpfen bereits ab 21 dpi, wobei generalisierte

Krampfanfälle ab 42 dpi beobachtet wurden (KRAMER, 2006). Auch bei IL-12-transgenen Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund kommt es nach der Infektion mit BoDV-1 zu neurologischen Symptomen infolge einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis mit ausgeprägter Astrogliose (FREUDE *et al.*, 2002; HOFER *et al.*, 2004). Die epileptiformen Krämpfe bei den verwendeten Mäusen mit moderater TNF-Überexpression und BoDV-1-Infektion sind daher Resultate des Zusammenspiels einer proinflammatorischen Prädisposition zusammen mit einem weiteren Insult im Gehirn, wie z.B. einer Virusinfektion. Weder BoDV-1-infizierte C57BL/6 wt-Mäuse, noch nicht infizierte TNF-tg/tg-, TNFR1ko-, oder TNFR2ko-Mäuse zeigen epileptiforme Krämpfe per se (ERICKSON *et al.*, 1994; HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; LUCAS *et al.*, 1997; MARCHETTI *et al.*, 2004; ROTHE *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu sind bei transgenen Mäusen mit selektiv hoher neuronaler oder astrozytärer TNF-Überexpression im gesamten Gehirn entzündliche Veränderungen sowie Ataxien und Krämpfe auch ohne virale Infektion beschrieben (PROBERT *et al.*, 1995; Übersicht bei PROBERT *et al.*, 1997). Die hier verwendeten TNF-transgenen Mäuse haben jedoch nur eine moderate neuronale TNF-Überexpression, hauptsächlich in Arealen des Vorderhirns wie Cortex cerebri und Hippocampus, was dem Expressionsmuster des NR2B-Gens entspricht, unter dessen Promotor die Expression des transgenen TNF kontrolliert wird (MARCHETTI *et al.*, 2004). Infolge erhöhter TNF-Level z.B. durch chronische Immunaktivierung im Gehirn bzw. Gliazell-bedingter TNF-Überexpression, sind krampfartige Aktivitäten in einem Computergestützten Modell von neuroglialen Wechselwirkungen beschrieben (SAVIN *et al.*, 2009). Darüber hinaus sind auch im Liquor von Menschen und Hunden mit Epilepsie erhöhte TNF-Konzentrationen beschrieben (MERBL *et al.*, 2014; SINHA *et al.*, 2008). Auch die Aktivierung anderer proinflammatorischer Mediatoren und Signalkaskaden wie z.B. des IL-1- und *Toll-like*-Rezeptors tragen zur epileptiformen Krampfentstehung bei (VEZZANI *et al.*, 2011b; Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2016b). Ursächlich kommen verschiedenste *Trigger*, wie z.B. virale, bakterielle oder parasitäre ZNS-Infektionen, Traumata, Tumore oder ein Schlaganfall für das Entstehen von epileptiformen Krämpfen in Frage (Übersicht bei VEZZANI *et al.*, 2016a). Anders als aufgrund der prokonvulsiven Eigenschaften des TNFR1 erwartet, zeigten die hier verwendeten TNFR2ko-Mäuse, bis auf wenige Ausnahmen, auch nach BoDV-1-Infektion keine epileptiformen Krämpfe oder neurologischen Auffälligkeiten. Dagegen zeigte ein BoDV-1-infiziertes TNFR1ko-Tier neurologische Auffälligkeiten entgegen unserer Hypothese, dass der TNFR2 einen protektiven antikonvulsiven Einfluss ausübt und daher TNFR1ko-Mäuse resistent gegenüber Krämpfen sein sollten (siehe auch 5.1.2.). Dies kann durch Überschneidungen der Signalwege der beiden TNF-Rezeptoren bedingt sein (Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011).

5.1.2. Entzündliche und degenerative Veränderungen und Nachweis von BoDV-N

Wie aufgrund vorhergehender Studien von Kramer und Schaudien erwartet, war unter den BoDV-1-infizierten Tieren die **nicht-eitrige Meningoenzephalitis** bei den TNF-tg/tg-Mäusen am stärksten ausgeprägt. Die TNF-tg/+ -Mäuse wiesen geringere entzündliche Veränderungen auf (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Weiterhin waren bei beiden Gruppen jeweils 42 dpi die entzündlichen Veränderungen ausgeprägter als 21 dpi (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Die Unterschiede der entzündlichen Veränderungen zwischen allen untersuchten Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko und TNFR2ko), sowie zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 dpi, waren jeweils statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$), was belegt, dass die Schwere der Entzündung mit der Infektionsdauer zunimmt. Die BoDV-1-infizierten wt-Mäuse zeigten zu keinem Zeitpunkt entzündliche Veränderungen. Dies zeigt, dass erhöhte TNF-Level bzw. ein proinflammatorischer Zustand Voraussetzungen für die Entstehung der Meningoenzephalitis infolge der BoDV-1-Infektion bei den Mäusen sind. Ebenfalls zeigten erwartungsgemäß keine der nicht infizierten oder Mock-infizierten Mäuse entzündliche Veränderungen, sodass ein statistisch hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) im Gegensatz zu den BoDV-1-infizierten Mäusen bestand. Auch andere (proinflammatorische) Zytokine führen bei vermehrter Expression im Zusammenhang mit einer BoDV-1-Infektion zu neurologischen Symptomen und vergleichbarer Infiltration von CD4- und CD8-T-Zellen, vor allem in den Gehirnregionen mit stärkster Transgenexpression, wie z.B. Infektionsstudien an IL-12-transgenen Mäusen gezeigt haben (FREUDE *et al.*, 2002; HOFER *et al.*, 2004). Die Aufregulation von weiteren proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-1 β , IL-2, IL-6 und IFN γ , sowie von *Toll-like*-Rezeptoren ist ebenfalls im Rahmen der Pathogenese epileptiformer Krämpfe bei Mensch und Tier, häufig im Zuge entzündlicher Veränderungen, beschrieben (CHOI *et al.*, 2009; DE SIMONI *et al.*, 2000; MERBL *et al.*, 2014; RAVIZZA *et al.*, 2005; SINHA *et al.*, 2008; VEZZANI *et al.*, 2011b). Daneben führt auch eine TMEV-Infektion bei Mäusen zu entzündlichen Veränderungen und epileptischen Krämpfen mit einhergehender Aufregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF (KIRKMAN *et al.*, 2010; SMEAL *et al.*, 2012). Beim Menschen sind ebenfalls verschiedenste Virusinfektionen mit Neuroinflammation und der Entstehung epileptischer Krämpfe assoziiert, wie z.B. mit verschiedenen Viren aus der Familie der *Flaviviridae*, mit Herpesviren, Masernvirus oder LCMV (BONTHIUS *et al.*, 2007; FOTHERINGHAM *et al.*, 2007; KARTAL *et al.*, 2015; KIJA *et al.*, 2015; Übersicht bei GETTS *et al.*, 2008).

Bei den TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen zeigten interessanterweise lediglich die BoDV-1-infizierten und unplanmäßig verstorbenen bzw. frühzeitig euthanasierten Tiere deutliche entzündliche Veränderungen. Diese Tiere wiesen ebenfalls klinische Symptome auf (siehe

5.1.1.), wie ein finaler generalisierter epileptiformer Krampf bei einer TNFR2ko-Maus bzw. die typische Körperhaltung wie bei an generalisierten epileptiformen Krämpfen gestorbenen Mäusen (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Daher ist davon auszugehen, dass auch die anderen beiden TNFR2ko-Mäuse an einem solchen Krampf verstorben sind. Dies war bei den TNFR2ko-Mäusen, aufgrund des Fehlens des TNFR2 mit seinen beschriebenen antikonvulsiven Eigenschaften und einer möglicherweise damit einhergehenden Förderung der prokonvulsiven Eigenschaften des TNFR1, auch zu erwarten (BALOSSO *et al.*, 2005). Auch das vorzeitig mit 29 dpi euthanasierte TNFR1ko-Tier zeigte ausgeprägte entzündliche Veränderungen im Gehirn, sodass nicht auszuschließen ist, dass dieses Tier einen epileptiformen Krampf hätte erleiden können, wenn es nicht zum Versuchsabbruch gekommen wäre. Dies steht in Diskrepanz zu unserer ursprünglichen Hypothese, dass nur die TNFR2ko-Mäuse nach BoDV-1-Infektion ausgeprägte entzündliche Veränderungen zeigen und krampfanfälliger sind als BoDV-1-infizierte TNFR1ko-Mäuse, da TNF über den TNFR1 primär proinflammatorisch und prokonvulsiv und über den TNFR2 primär anti-inflammatorisch und antikonvulsiv wirkt (BALOSSO *et al.*, 2005; FONTAINE *et al.*, 2002). Vorhergehende Studien an TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen haben bereits gezeigt, dass TNFR1ko-Mäuse eine verminderte Krampfanfälligkeit und Neuroprotektion infolge einer Langzeit-NFκB-Aktivierung aufweisen (BALOSSO *et al.*, 2005; FONTAINE *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2004). Bei TNFR2ko-Mäusen wurden längere Krämpfe und lediglich eine transiente NFκB-Aktivierung nachgewiesen (BALOSSO *et al.*, 2005; FONTAINE *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2004). Über diese transiente NFκB-Aktivierung kann auch der TNFR1 primär protektiv wirken (Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011 und WAJANT and SCHEURICH, 2011). Wird dieser Signalweg des TNFR1 jedoch unterdrückt, kommt es zur Apoptose mit den damit einhergehenden neurodegenerativen und prokonvulsiven Eigenschaften (siehe auch Abb. 8) (Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Daneben gibt es aber auch Überschneidungspunkte der TNFR1- und TNFR2-Signalwege, worüber es zu Wechselwirkungen kommen kann, welche wiederum von der Höhe der TNF-Level bzw. der Dauer der Einwirkung erhöhter TNF-Level sowie von der jeweiligen TNF-Rezeptor-Expression abhängig sein können (Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011).

Neben den entzündlichen Veränderungen fielen in der Gruppe der BoDV-1-infizierten Tiere bei den 42 Tage alten wt-, TNF-tg/+-, TNF-tg/tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen **Vakuolisierungen** vor allem im Neuropil von grauer und weißer Substanz im Thalamus sowie vereinzelt auch im Rhombencephalon und/oder im Striatum auf. Vakuolisierungen in der grauen und weißen Substanz können vielfältige Ursachen haben, die von genetischen Defekten bis zu metabolischen oder toxischen Einflüssen reichen (Übersicht bei ELLISON *et al.*, 2013 und VINTERS *et al.*, 2015). In der weißen Substanz kann diese Veränderung auf

einem Ödem in den Myelinfasern beruhen und ist bei toxischen und metabolischen Veränderungen wie z.B. mitochondrialen Störungen oder Vitamin B12-Mangel beschrieben, kann aber auch als Artefakt entstehen, wenn das Gewebe bei der Prozessierung länger (48 Stunden) in 70 %igem Alkohol verbleibt (WELLS and WELLS, 1989; Übersicht bei ELLISON *et al.*, 2013 und VINTERS *et al.*, 2015). Dies war in der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht der Fall. Vakuolisierungen in der grauen Substanz kommen z.B. bei genetischen Defekten, transmissiblen Enzephalopathien und bei manchen Virusinfektionen (z.B. mit Retroviren) vor. Eine genetische Ursache im Zusammenhang mit der Mauslinie ist denkbar, da Vakuolisierungen in vorhergehenden Studien der eigenen Arbeitsgruppe auch bei nicht infizierten Mäusen der gleichen Mauslinie aufgetreten sind (SCHAUDIEN, 2007). Die Vakuolen sind häufig intraneuronal zu finden, was hier jedoch meist nicht der Fall war (GARDNER, 1985; GERHAUSER *et al.*, 2013; WELLS *et al.*, 1987; WELLS and WELLS, 1989). In der Studie von Schaudien konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass sich die Vakuolen in den neuronalen Fortsätzen bzw. Myelinscheiden befinden, was bei verschiedenen degenerativen und hypoxischen Prozessen auftreten kann (ADORNATO *et al.*, 1972; SCHAUDIEN, 2007). Dennoch ist ein ursächlicher Zusammenhang der Vakuolisierungen mit der BoDV-1-Infektion wahrscheinlich, da die Veränderungen in der hier vorliegenden Studie nur bei den BoDV-1-infizierten Mäusen auftraten. Ein Zusammenhang mit möglicherweise durch die BoDV-1-Infektion ausgelösten metabolischen Veränderungen, ggf. auch in den Astrozyten, ist ebenfalls nicht auszuschließen. Nach der BoDV-1-Infektion sind metabolische Veränderungen bereits beschrieben, so z.B. im Kohlenhydrat- oder Aminosäurestoffwechsel (HUANG *et al.*, 2012; CZERWONKA und MAZUREK, persönliche Mitteilung). Daneben sind Vakuolisierungen auch als altersbedingte Veränderungen bei verschiedenen Tieren beschrieben (GAVIER-WIDEN *et al.*, 2001; GERHAUSER *et al.*, 2013; JAHNS *et al.*, 2006). Da die hier verwendeten Mäuse maximal 42 Tage alt waren, sind altersbedingte Ursachen eher unwahrscheinlich.

Die ungeplant verstorbenen TNFR2ko-Mäuse bzw. das euthanasierte TNFR1ko-Tier zeigten weiterhin als einzige Tiere **Unregelmäßigkeiten in der CA3-Region** des Hippocampus mit Auflockerung der Neurone und vereinzelt hypereosinophilen geschrumpften Neuronen (**Neuronennekrosen**). In einem Epilepsiemodell mit TMEV-infizierten C57BL6-Mäusen zeigten diese ebenfalls Neuronennekrosen sowie Verlust neuronaler Zellen in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus in der akuten Phase der Infektion, jedoch anders als hier, in der CA1-Region, wohingegen die CA3-Region bei den TMEV-infizierten Tieren ohne besonderen Befund war (SMEAL *et al.*, 2012; STEWART *et al.*, 2010). Möglicherweise ist bei BoDV-1-infizierten Mäusen die CA3-Region stärker betroffen, da es dort z.B. zu verminderter Expression des neuronalen *gap-junction*-Proteins Connexin 36 und damit zu einem veränderten neuronalen Netzwerk kommt, wie bei neonatal BoDV-1-infizierten Lewis-Ratten

gezeigt werden konnte (KÖSTER-PATZLAFF *et al.*, 2009). Diese Ratten zeigten ebenfalls neuronale Nekrosen (KÖSTER-PATZLAFF *et al.*, 2007). Ebenfalls sind bei neonatal BoDV-1-infizierten Lewis-Ratten Veränderungen astroglialer *gap-junction*-Proteine beschrieben, wobei es zu einer erhöhten Expression von Connexin 43 im Gyrus dentatus und zu einer verminderten Expression in der CA3-Region einige Wochen nach der BoDV-1-Infektion kommt (KÖSTER-PATZLAFF *et al.*, 2007). Connexin 30 ist in beiden Regionen vermehrt exprimiert nach BoDV-1-Infektion (KÖSTER-PATZLAFF *et al.*, 2007). Beides kann als direkte Folge der beobachteten Neuronendegenerationen in diesen Regionen angesehen werden (KÖSTER-PATZLAFF *et al.*, 2007). Inwiefern diese Ergebnisse auf BoDV-1-infizierte Mäuse übertragbar sind, müsste in weiteren Studien zur neuronalen und astroglialen Connexin-Expression bei Mäusen geklärt werden.

Daneben war bei den hier untersuchten BoDV-1-infizierten Mäusen auffällig, dass ein Großteil der Neurone der CA1-Region kein BoDV-N aufwies, was möglicherweise mit unterschiedlichen Neuronenverschaltungen und Veränderungen in PKC-Signalwegen im Zusammenhang steht (siehe auch nächster Absatz) (SCHWEMMLE *et al.*, 1997; VOLMER *et al.*, 2006). Daher ist die CA3-Region möglicherweise empfänglicher für BoDV-1-bedingte Neuronennekrosen und synaptische Dysfunktionen (VOLMER *et al.*, 2006). Die regionspezifische unterschiedliche Verteilung der degenerativen Veränderungen mit Neuronennekrosen hängen also wahrscheinlich auch mit der unterschiedlichen Infektion der Neuronenpopulationen zusammen, welche zusätzlich auch von der Viruspräparation bzw. dem Virusisolat abhängig sind (HERDEN *et al.*, 2000). Je nach Virusisolat findet sich BoDV-N vor allem in der CA3-Region und der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus bzw. in der CA3-Region und den Fascia dentata (HERDEN *et al.*, 2000). Bei persistent BoDV-1-infizierten Ratten kommt es z.B. unter anderem zu Degenerationen der Granularzellen im Gyrus dentatus (NARAYAN *et al.*, 1983).

Bei vereinzelten BoDV-1-infizierten Mäusen konnte in der hier vorliegenden Arbeit ein geringgradiger **Hydrocephalus internus** festgestellt werden. Die Induktion eines Hydrocephalus internus ist infolge einer intrazerebralen BoDV-1-Infektion von vier Wochen alten, sowie von adulten Lewis-Ratten beschrieben (IRIGOIN *et al.*, 1990; NARAYAN *et al.*, 1983). Der genaue Pathomechanismus ist nicht bekannt, jedoch ist es möglich, dass der Hydrocephalus internus sekundär infolge der vorausgehenden ausgeprägten entzündlichen Veränderungen und Neuronendegenerationen entstanden ist (IRIGOIN *et al.*, 1990; NARAYAN *et al.*, 1983). Ebenfalls spielen möglicherweise Sekretionsstörungen im subkommissuralen Organ ursächlich eine Rolle, welches in der hier vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht wurde (IRIGOIN *et al.*, 1990). Weiterhin zeigten jedoch auch vereinzelte infizierte Mäuse ohne entzündliche Veränderungen einen Hydrocephalus internus bereits mit

21 dpi. Viral bedingte kongenitale Gehirnmissbildungen einschließlich Hydrocephalus internus sind u.a. bei Orthobunyaviren, wie z.B. dem Schmallenberg-Virus, oder Flaviviren, wie z.B. dem Bovinen Virusdiarrhö-Virus, oder dem neu entdeckten Zika-Virus beschrieben, bei welchen es zur Vermehrung der Viren in sich noch teilenden Gehirnzellen wie z.B. den Körnerzellen im Kleinhirn kommt (AGERHOLM *et al.*, 2015; HERDER *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2016). Eine intrauterine BoDV-1-Infektion ist jedoch in der hier vorliegenden Arbeit ausgeschlossen. Ein nicht viral bedingter kongenitaler Hydrocephalus internus kann jedoch ursächlich nicht ausgeschlossen werden.

Bezüglich des **Nachweises des viralen Nukleoproteins (BoDV-N)** und dessen Verteilung im Gehirn fanden sich bei den BoDV-1-infizierten Mäusen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko). Vergleichbar zu vorhergehenden Studien bei BoDV-1-infizierten Mäusen und Ratten konnte bereits 21 dpi BoDV-N in Zytoplasma und Zellkernen von Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und auch einzelnen Ependymzellen sowie im Neuropil in allen Gehirnregionen nachgewiesen werden (CARBONE *et al.*, 1991; CARBONE *et al.*, 1989; HERDEN *et al.*, 2000; KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; MORALES *et al.*, 1988; WERNER-KEIŠS, 2006; WERNER-KEIŠS *et al.*, 2008). Da sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des BoDV-N-Nachweises zwischen den wt-Mäusen und den verschiedenen Mausstämmen mit verändertem TNF-System fanden, beeinflusst ein verändertes TNF-System die Virusausbreitung im Gehirn nicht, bzw. kann BoDV-1 sich an erhöhte Zytokinwerte/veränderte Zytokinsysteme, z.B. durch die Interaktion mit bestimmten zellulären Signalwegen wie z.B. der Inhibition der NFκB-Aktivierung, adaptieren (MAKINO *et al.*, 2015). Zwischen den Untersuchungszeitpunkten 21 und 42 dpi konnte eine statistisch signifikante Zunahme ($p = 0,016$) der Anzahl an BoDV-N-positiven Zellen in allen untersuchten Mausstämmen nachgewiesen werden, was auch vergleichbar mit vorhergehenden Studien bei anderen Tieren ist und für eine zunehmende Virusausbreitung mit der Zeit spricht (HERDEN *et al.*, 2000; KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; WERNER-KEIŠS *et al.*, 2008). Unabhängig von Untersuchungszeitpunkt und Mausstamm, war der Großteil der Zellen der CA1-Region des Hippocampus immer BoDV-N-negativ, was sich ebenfalls mit vorhergehenden Untersuchungen bei BoDV-1-infizierten Mäusen und Ratten deckt (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012; MORALES *et al.*, 1988). Diese regionenspezifische unterschiedliche BoDV-N-Verteilung ist auch von der Viruspräparation bzw. des Virusisolats (siehe auch vorheriger Absatz) abhängig (HERDEN *et al.*, 2000). Bezüglich des funktionellen Aufbaus des Hippocampus werden die Granularzellen des Gyrus dentatus zu einem großen Teil von afferenten Fasern aus dem entorhinalen Cortex gespeist. Die Granularzellen sind im weiteren Verlauf mit den Pyramidenzellen der CA3-Region verbunden, welche wiederum mit

den Neuronen der CA1-Region verbunden sind (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2005). Die ϵ -Isoform der PKC phosphoryliert das BoDV-P, was wiederum die Phosphorylierung von endogenen PKC-Substraten kompetitiv hemmt (PRAT *et al.*, 2009; SCHWEMMLE *et al.*, 1997; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Dadurch interferiert BoDV-1 mit der präsynaptischen Neurotransmitterabgabe und damit der synaptischen Plastizität (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2005; PRAT *et al.*, 2009; SCHWEMMLE *et al.*, 1997; VOLMER *et al.*, 2006; Übersicht bei PLANZ *et al.*, 2009). Da die Phosphorylierung von P auch für eine effiziente Ausbreitung von BoDV-1 nötig ist, können Abweichungen der PKC-Signalwege oder Änderungen in der Neuronenverschaltung im Hippocampus erklären, warum ein Großteil der Neurone der CA1-Region BoDV-N-negativ war (SCHMID *et al.*, 2010). Bei Mäusen welche chronischem mildem Stress ausgesetzt sind, sind verminderte interneuronale dendritische Verzweigungen in der CA1-, jedoch nicht in der CA3-Region beschrieben, was auch hier eine Rolle spielen könnte, da auch die BoDV-1-Infektion und die Versuchssituation an sich mit den regelmäßigen Untersuchungen eine gering- bis mittelgradige Stresssituation darstellt (GILABERT-JUAN *et al.*, 2017). Mittels in situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die CA1-Region von Mäusen stärkere mRNA-Signale für die NR2B- bzw. ϵ 2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im Vergleich zur CA3-Region aufweist (WATANABE *et al.*, 1993). Dagegen fand sich in einer anderen Studie mittels Immunhistologie eine vergleichbare Expression der NR2B-Untereinheit in der CA1- und CA3-Region von Mäusen, welche durch Stresseinflüsse in beiden Regionen gleichermaßen aufreguliert werden konnte (HU *et al.*, 2016). Da bei den hier verwendeten TNF-tg-Mäusen das transgene TNF unter der Kontrolle der NR2B-Untereinheit exprimiert wird, können sich NR2B-Unterschiede auch auf die TNF-Level in der CA1- und CA3-Region auswirken (MARCHETTI *et al.*, 2004). Da zwischen den wt- und den TNF-tg-Mäusen keine Unterschiede in der BoDV-N-Verteilung zu finden waren, scheint dies im vorliegenden Modell keine Rolle zu spielen. Nähere Untersuchungen der CA1- und CA3-Region von BoDV-1-infizierten Mäusen sind notwendig, um die beobachteten Unterschiede in dieser Gehirnregion näher zu charakterisieren.

5.1.3. Astrozytenaktivierung und Nachweis von GFAP

Bezüglich der astrozytären Veränderungen wurden sowohl die Form, als auch die Anzahl der Astrozyten in der H&E-Färbung, sowie mittels immunhistologischem GFAP-Nachweis beurteilt. Bereits in der H&E-Färbung ließen sich vereinzelte **aktivierte Astrozyten** bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäusen 21 dpi in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate nachweisen. Bis 42 dpi nahm der Grad und die Anzahl der Astrozytenaktivierung bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäusen hochsignifikant zu ($p < 0,0001$). Zu diesem Zeitpunkt waren hypertrophe aktivierte Astrozyten mit **degeneriert erscheinenden Zellkernen** und Kernwandhyperchromasie zu finden. In

vorhergehenden Studien der eigenen Arbeitsgruppe waren bereits ab 21 dpi die ersten hypertrophen Astrozyten mit geschwollenen und degeneriert erscheinenden Zellkernen bei diesen Tieren auffällig (KRAMER, 2006). Zwischen den verschiedenen Mausstämmen fanden sich ebenfalls hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$), so zeigten die BoDV-1-infizierten wt-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse morphologisch keine hypertrophen aktivierten Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen. Ausnahmen hiervon bildete die 29 dpi wegen klinischer Auffälligkeiten euthanasierte TNFR1ko-Maus sowie die 30 dpi an einem generalisierten epileptiformen Krampfanfall verstorbene TNFR2ko-Maus, welche beide zahlreiche hypertrophe aktivierte Astrozyten in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate aufwiesen. Darunter befanden sich auch Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen mit Kernwandhyperchromasie. Diese beiden Tiere zeigten auch die stärksten entzündlichen Veränderungen in der Gruppe der TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse. Daher ist davon auszugehen, dass die von den anderen Mäusen dieser Gruppe abweichenden astrozytären und entzündlichen Veränderungen in direktem Zusammenhang mit dem bei der TNFR2ko-Maus nachgewiesenen generalisierten epileptiformen Krampfanfall und den bei der TNFR1ko-Maus nachgewiesenen klinischen Veränderungen stehen, die als Anzeichen für einen bevorstehenden epileptiformen Krampf gedeutet werden können (siehe auch 5.1.1. und 5.1.2.).

Die **Morphologie** der degeneriert erscheinenden astroglialen Zellkerne kann auf eine Form des Zelltods hinweisen, da es z.B. bei der Apoptose zur Chromatinkondensation kommt (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014). Hierzu passt, dass vermehrt bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen diese degeneriert erscheinenden Astrozytenzellkerne auftraten, was implizieren könnte, dass die erhöhten TNF-Konzentrationen zusammen mit der Virusinfektion den extrinsischen TNFR1-vermittelten Apoptoseweg aktivieren (siehe auch 5.1.5. und 5.2.2.). Bei keiner der Mock-infizierten Mäuse konnten, unabhängig vom Mausstamm, derartige Astrozyten nachgewiesen werden. Insgesamt kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass hypertrophe aktivierte Astrozyten mit zum Teil degeneriert erscheinenden Zellkernen ausschließlich in Verbindung mit der Virusinfektion und Entzündungszellinfiltraten nachweisbar waren und demnach der Zusammenhang zwischen der (Meningo)enzephalitis, den TNF-Levels und der Astrozytenaktivierung, wie von Kramer postuliert, bestätigt werden konnte (KRAMER *et al.*, 2012). Dies scheint jedoch unabhängig vom TNFR-Status zu sein, wobei nach der BoDV-1-Infektion von TNF-tg-Mäusen beide TNFR aufreguliert werden (SCHAUDIEN, 2007; SCHAUDIEN *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass verschiedene Insulte im Gehirn, einschließlich Virusinfektionen, die Aktivierung von Astrozyten (sogenannte reaktive Astroglie) zur Folge haben (ZLOTNIK, 1968). So zeigen auch IL-12-transgene Mäuse nach BoDV-1-Infektion Entzündungszellinfiltrate mit einhergehender ausgeprägter Astroglie, vor allem in den Gehirnregionen mit stärkster Transgenexpression (FREUDE *et al.*, 2002). Auch

infolge von epileptischen Krämpfen bzw. in epileptischem Gehirngewebe sind aktivierte Astrozyten und Mikroglia, wie auch bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg-Mäusen und der an einem generalisierten epileptiformen Krampf gestorbenen TNFR2ko-Maus, beschrieben (CHOI *et al.*, 2009; RAVIZZA *et al.*, 2005).

Die Aktivierung von Astrozyten/Astrogliose geht mit einer **Aufregulation von GFAP** sowie häufig neben einer Hypertrophie auch mit einer Proliferation und Überlappung von benachbarten astrozytären Fortsätzen einher, wobei letzteres bei der Entstehung von Epilepsie eine Rolle spielt (EDDLESTON and MUCKE, 1993; OBERHEIM *et al.*, 2008; Übersicht bei ANDERSON *et al.*, 2014). Durch die Überlappung der astrozytären Fortsätze kommt es zum Verlust bzw. zum Verschwimmen der Grenzen astrozytärer Domänen, was mit zusätzlichen Dendritensprossungen und der Bildung neuer (exzitatorischer) Synapsen einhergehen kann und so Hyperexzitabilität und die Entstehung von Epilepsie begünstigen kann (OBERHEIM *et al.*, 2008). In der hier vorliegenden Arbeit konnte mittels GFAP-Immunhistologie eine hochsignifikante Hypertrophie und Hyperplasie GFAP-positiver Astrozyten bei BoDV-1-infizierten Mäusen, im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen, festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei anderen End- und Fehlwirten des BoDV-1, wie z.B. Ratten und Pferden, gemacht (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1996; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 1999; KATZ *et al.*, 1998; Übersicht bei ROTT and BECHT, 1995). Dies steht im Einklang mit einer anderen Studie an Mäusen, bei welcher nach einer Infektion mit dem *Japanese encephalitis virus* eine GFAP-Aufregulation in Astrozyten, einhergehend mit längeren und dickeren Fortsätzen, sowie eine signifikante Zunahme der Anzahl dieser aktivierten Astrozyten gezeigt werden konnte (MISHRA *et al.*, 2007). Neben den statistisch hochsignifikanten Unterschieden ($p < 0,0001$) zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen fanden sich auch statistisch hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$) zwischen den verschiedenen Mausstämmen und den verschiedenen Altersgruppen 21 und 42 Tage bzw. 21 und 42 dpi bezüglich der Anzahl GFAP-positiver Astrozyten. So zeigten unter den BoDV-1-infizierten Tieren die TNF-tg/tg-Mäuse mehr GFAP-positive Zellen als die TNF-tg/+Mäuse, welche wiederum mehr GFAP-positive Astrozyten zeigten als die wt-Mäuse. Insbesondere auch die BoDV-1-infizierten TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse zeigten mehr GFAP-positive Zellen als die wt-Mäuse. Vermehrt GFAP-positive Astrozyten mit deutlich vergrößerten Zellkernen (bis zu 10 – 12 μm) fanden sich vor allem bei den 42 Tage alten BoDV-1-infizierten Mäusen mit verändertem TNF-System (TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko). Daneben zeigten auch ein 21 Tage altes TNFR1ko-Tier, das 29 dpi wegen Verhaltensauffälligkeiten euthanasierte TNFR1ko-Tier sowie die 30 dpi an einem generalisierten epileptiformen Krampf verstorbene und die 37 dpi nach Verhaltensauffälligkeiten verstorbene TNFR2ko-Maus eine deutlich erhöhte Anzahl GFAP-positiver hypertropher Astrozyten mit deutlich vergrößerten Zellkernen, insbesondere

bei den klinisch auffälligen Tieren. Auch in einer vorhergehenden Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte bei BoDV-1-infizierten TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäusen eine Vergrößerung der Zellkerndurchmesser bis zu ca. 10 µm festgestellt werden (SCHAUDIEN, 2007). Die Vergrößerung der astrozytären Zellkerne steht also im Zusammenhang mit den entzündlichen Veränderungen, da nahezu ausschließlich die Tiere mit den stärksten entzündlichen Veränderungen auch deutlich vergrößerte astrozytäre Zellkerne aufwiesen, welche überwiegend in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate zu finden waren. Die Zunahme der Anzahl GFAP-positiver Astrozyten hingegen scheint sowohl von Veränderungen des TNF-Systems, als auch vom Infektionsstatus der Tiere abhängig zu sein. Sie ist jedoch unabhängig von den entzündlichen Veränderungen, da insbesondere bei den BoDV-1-infizierten TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen vermehrt GFAP-positive Astrozyten festzustellen waren, die jedoch, abgesehen von den klinisch auffälligen Tieren, keine Entzündungszellinfiltrate aufwiesen. Bei den BoDV-1-infizierten wt-Mäusen hingegen war keine vermehrte Anzahl an GFAP-positiven Astrozyten zu finden.

Möglicherweise hängt es von der Art des Insultes ab, ob die Astrozyten im Rahmen reaktiver Astroglieose überwiegend mit einer Proliferation, einer Hypertrophie oder beidem reagieren. Die astrozytäre Hypertrophie und Proliferation sind bereits infolge von verschiedenen akuten und persistierenden Virusinfektionen des Gehirns beschrieben, wobei auch bekannt ist, dass dabei besonders große hypertrophe Astrozyten in Entzündungsarealen und Arealen mit degenerativen Veränderungen vorkommen (ZLOTNIK, 1968). Auch nach BoDV-1-Infektion von adulten Lewis-Ratten ist eine reaktive Astroglieose beschrieben (DESCHL *et al.*, 1990; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005). Daneben sind jedoch auch Entzündungszellinfiltrate, Astroglieose und Mikroglieose sowie damit einhergehende Demyelinisierungen und epileptiforme Krämpfe bei TNF-transgenen Mäusen mit diffuser neuronaler TNF-Überexpression, ohne zusätzliche Virusinfektion, beschrieben, was belegt, dass in entsprechender Ausprägung TNF allein auch zu neuroinflammatorischen Veränderungen, einschließlich Gliaaktivierungen, führen kann (PROBERT *et al.*, 1995).

Aktiviert Astrozyten zeigen eine veränderte Genexpression, was eine unterschiedliche Abgabe von Immun- und Entzündungsmediatoren zur Folge hat und sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Effekte haben kann (JANG *et al.*, 2013; JHA *et al.*, 2016). Dieses Phänomen wird in Anlehnung an die bereits zuvor bekannte heterogene Aktivierung von Mikroglia „funktionelle Polarisierung“ genannt, wobei die klassische Aktivierung zur vermehrten Abgabe proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF oder IL-1β und die alternative Aktivierung zur vermehrten Abgabe anti-inflammatorischer Zytokine wie z.B. Arginase 1 oder IL-10 führt (JANG *et al.*, 2013; JHA *et al.*, 2016). In der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate wurden in der hier vorliegenden Studie neben den aktivierten Astrozyten auch aktivierte Mikroglia beobachtet. Welche Aktivierung von Astrozyten (und Mikroglia) genau vorliegt, ob

klassische oder alternative Aktivierung, und welches Genexpressionsmuster welcher Zytokine/Chemokine genau vorliegt muss in weiteren Studien untersucht werden. Initiale Studien zeigen, dass die hypertrophen Astrozyten nach BoDV-1-Infektion LCN2, einen klassischen Aktivator der proinflammatorischen Aktivierung, exprimieren (VIENENKÖTTER *et al.*, 2016). Die Aufregulation von IL-1, IL-6 und IFN γ wurde bereits an BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen gezeigt (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Weiterhin bestehen enge Wechselwirkungen zwischen der Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia. So konnte in *in vitro* Studien an primären Mikrogliaulturen von Ratten festgestellt werden, dass zur Aktivierung von Mikroglia die Zugabe von BoDV-1-Virususpension hergestellt aus persistent infizierten Oligodendrozyten, sowie die Zugabe von BoDV-1-infizierten kortikalen Neuronen allein nicht ausreicht (OVANESOV *et al.*, 2008a; OVANESOV *et al.*, 2006). Dagegen konnte durch die BoDV-1-Infektion von neuroglialen Mischkulturen eine Aktivierung der in diesen Kulturen enthaltenen Mikroglia beobachtet werden, wobei die Mikroglia selbst nicht infiziert waren, die Neurone und Astrozyten der Mischkulturen jedoch schon (OVANESOV *et al.*, 2008a; OVANESOV *et al.*, 2006). Daneben konnte im Vergleich zu nicht infizierten gleichartigen Mischkulturen, bei BoDV-1-infizierten Mischkulturen eine signifikant stärkere Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Abgabe von TNF, IL-1 β und IL-10 beobachtet werden (OVANESOV *et al.*, 2006). Bezüglich der zeitlichen Abläufe, wurde in weiteren Studien gezeigt, dass persistent BoDV-1-infizierte Neurone zunächst zur Aktivierung von Astrozyten und diese dann zur Aktivierung der Mikroglia führen (OVANESOV *et al.*, 2008a). Eine vergleichbare Kaskade läuft sehr wahrscheinlich auch *in vivo* ab. An neonatal BoDV-1-infizierten Ratten wurde festgestellt, dass eine Mikrogliaaktivierung zeitlich deutlich vor Neuronenuntergängen stattfand (HERDEN *et al.*, 2005; OVANESOV *et al.*, 2008b). Es konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass eine Mikrogliaaktivierung einer Astrozytenaktivierung und -proliferation auch vorausgehen kann (HERDEN *et al.*, 2005). In der hier vorliegenden Arbeit wurden aktivierte hypertrophe Astrozyten und aktivierte Mikroglia stets gemeinsam und stets in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate beobachtet. Welche Faktoren genau die Aktivierung der Mikroglia auslösen, muss in weiteren Studien geklärt werden. Vermutet wurden bisher Hitze-resistente lösliche Faktoren (OVANESOV *et al.*, 2008a). Auch von CD4-positiven T_H1-Helferzellen abgegebene lösliche Faktoren sind *in vitro* in der Lage Mikroglia proinflammatorisch zu aktivieren (PRAJEETH *et al.*, 2014). Typischerweise sezernieren T_H1-Helferzellen IFN γ , das auch von Astrozyten sezerniert wird, jedoch nur bei gleichzeitiger TNF-Stimulation (100 U/ml). Möglicherweise spielt dieser Mechanismus auch bei den hier untersuchten TNF-tg/tg-Mäusen eine wichtige Rolle, da bei diesen Mäusen nach BoDV-1-Infektion, neben den klinisch auffälligen gestorbenen bzw. vorzeitig euthanasierten TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen, die deutlichsten Entzündungszellinfiltrate sowie die deutlichste Astrozytenaktivierung und auch Mikrogliaaktivierung festgestellt wurden. Daher sollten

weiterführend die Wechselwirkungen zwischen Astrozyten und Mikroglia näher charakterisiert werden und welche Rolle sie für die Induktion epileptiformer Krämpfe bei diesen Tieren spielen. Möglicherweise könnte dann eine Modulation der Astrogliose (z.B. hinsichtlich einer Typ 2 Polarisierung bzw. alternativen Aktivierung) zur Behandlung von Epilepsien zukünftig beitragen.

Aktivierte Astrozyten dienen im Rahmen von infektiösen und autoimmunen Erkrankungen des ZNS auch der **Antigenpräsentation** für T-Zellen, da sie infolge von IFN γ -Stimulation neben MHCI- auch MHCII-Antigene exprimieren können (WONG *et al.*, 1984; Übersicht bei DONG and BENVENISTE, 2001). Es ist bekannt, dass die BoDV-1-Infektion eine T-Zell-Antwort mit IFN γ - und TNF-Produktion zur Folge hat und zu einer CD4- und CD8-T-Zell-vermittelten immunpathologisch bedingten Meningoenzephalitis führt (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998; HATALSKI *et al.*, 1998; HERDEN *et al.*, 2013; KRAMER *et al.*, 2012; STITZ *et al.*, 2002; Übersicht bei TIZARD *et al.*, 2016). Demnach nehmen die aktivierten Astrozyten in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate neben der Aufgabe der Zytokinabgabe wahrscheinlich auch eine antigenpräsentierende Funktion gegenüber den T-Zellen wahr, was möglicherweise die Immunpathogenese der BoDV-1-Infektion fördert. *In vitro* konnte bereits bestätigt werden, dass BoDV-1-infizierte Astrozyten Antigen präsentieren (RICHT and STITZ, 1992).

5.1.4. Nachweis von GLT1 und GLAST

Glutamat ist als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter wesentlich an der Entstehung von neuronaler Hyperexzitabilität und daraus resultierenden epileptiformen Krämpfen beteiligt. Es wirkt in zu hohen Konzentrationen neurotoxisch, wobei die extrazelluläre Glutamatkonzentration im Gehirn unter physiologischen Bedingungen bei ca. 2 μ M liegt und *in vitro* in einer Neurotoxizitätsstudie eine ED₅₀ von 50 – 100 μ M Glutamat bei 5-minütiger Exposition beschrieben ist (CHOI *et al.*, 1987; ROTHSTEIN *et al.*, 1996; TANAKA *et al.*, 1997; Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015). Astrozyten stellen die Hauptaufnahmequelle von Glutamat dar, was vor allem über GLT1 und GLAST vermittelt wird (ROTHSTEIN *et al.*, 1996). Unter diesen beiden Glutamatttransportern spielt **GLT1** mit etwa 95 % die größte Rolle bei der Glutamataufnahme (MARAGAKIS *et al.*, 2004; ROTHSTEIN *et al.*, 1996; TANAKA *et al.*, 1997). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die astrozytären Veränderungen auch zu Veränderungen der Glutamatttransporterexpression führen. Insgesamt lagen zwischen den untersuchten Mausstämmen statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der GLT1-Expression vor ($p = 0,017$). So zeigten die Mäuse mit verändertem TNF-System global betrachtet eine stärker ausgeprägte GLT1-Expression als die wt-Mäuse (TNF-tg/tg, TNFR1ko und TNFR2ko im Mittel Score 2-3, wt-Mäuse im Mittel Score 1-2). Dies kann zumindest bei den TNF-tg/tg-Mäusen damit im Zusammenhang stehen, dass TNF zu einer GLT1-

Aufregulation führt, was in primären Astrozytenkulturen gezeigt werden konnte (DUMONT *et al.*, 2014; FOCANT *et al.*, 2011). Ebenfalls fand sich eine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Mausstämmen und dem Alter der Tiere ($p = 0,017$). Innerhalb der wt-Mäuse kam es nämlich zu einer altersabhängigen Zunahme der GLT1-Expression, was bei den Mäusen mit verändertem TNF-System nicht der Fall war, vermutlich weil diese bereits mit 21 Tagen eine höhere, möglicherweise TNF-Level-abhängige GLT1-Expression aufwiesen (FOCANT *et al.*, 2011). Auf der anderen Seite ist aber auch eine TNF-vermittelte Herunterregulation von GLT1, im Anschluss an eine primäre, transiente GLT1-Aufregulation, in organotypischen *Slice*-Kulturen und in einem anderen viralen Enzephalomyelitis Modell bei NSV-infizierten Ratten beschrieben (CARMEN *et al.*, 2009). Die TNF-vermittelte Wechselwirkung mit GLT1 hängt u.a. wahrscheinlich von der *Splice*-Variante des GLT1 ab, wobei GLT1a lediglich transient und GLT1b längerfristig aufreguliert wird, wie in primären Astrozytenkulturen gezeigt werden konnte (FOCANT *et al.*, 2011).

Bezüglich der **GLAST**-Expression zeigten die 42 Tage alten Mäuse aller Gruppen, unabhängig von der BoDV-1-Infektion, insgesamt eine statistisch signifikant stärker ausgeprägte Expression als die 21 Tage alten Mäuse ($p = 0,0071$). Dies kann dafür sprechen, dass es in der Entwicklung zu einer altersabhängigen Aufregulation dieses Glutamattransporters kommt. Solch eine altersabhängige Glutamattransporteraufregulation ist auch im Zusammenhang mit der Reifung von Gliazellen beschrieben, was auch hier eine Rolle spielen kann, da es sich von den Altersgruppen her um jugendliche bis jung-adulte Mäuse handelt (AHLEMEYER *et al.*, 2013; KEHR, 2016; UNTIET *et al.*, 2017).

Auffällig bezüglich der Expression **beider Glutamattransporter** war, dass häufig in der Umgebung der entzündlichen Veränderungen lediglich eine sehr geringe granuläre Reaktion nachzuweisen war, was für eine verminderte Expression in diesen Arealen spricht. Dieses Phänomen war unabhängig von der Glutamattransporterexpression im restlichen Gewebe.

Bei viralen Enzephalomyelitiden infolge experimenteller NSV-Infektion ist beschrieben, dass in der akuten Infektionsphase die GLT1-Expression abfällt, was durch das proinflammatorische Zytokin IL1 β vermittelt ist (PROW and IRANI, 2008). IL1 β wird auch bei der klassischen Aktivierung von Astrozyten aufreguliert (JANG *et al.*, 2013). Demnach kann eine Aufregulation von IL1 β im Bereich der Entzündungszellinfiltrate, welche mit der dortigen ausgeprägten Aktivierung von Astrozyten im Zusammenhang steht, Ursache für die dortige verminderte GLT1-Expression sein. Dazu passt, dass auch nach einer BoDV-1-Infektion, bei Mäusen ein signifikanter Anstieg an IL-1 zu finden ist, welcher bei TNF-tg-Mäusen deutlicher ausgeprägt ist, als bei wt-Mäusen (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Im Rahmen von Neuroinflammation aktivierte Mikroglia führen auch zur Abnahme der astrozytären GLAST-Expression, welche durch TNF-Abgabe vermittelt ist (TILLEUX and HERMANS, 2008). Durch Neuroinflammation aktivierte Mikroglia geben auch Glutamat ab und durch eine

Erhöhung intrazellulärer Glutamat Spiegel in Astrozyten kommt es ebenfalls zur Herunterregulation von GLAST (TAKAKI *et al.*, 2012). Auch in dem hier vorliegenden Mausmodell mit BoDV-1-Infektion fanden sich vermehrt aktivierte Mikroglia in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate, welche für die lokale Verminderung der GLAST-Expression verantwortlich sein können. Daneben ist eine Verminderung der GLAST-Expression bei T-Zell-vermittelten autoimmunen Entzündungen beschrieben, welche ebenfalls durch TNF vermittelt ist (KORN *et al.*, 2005). Da auch die BoDV-1-Infektion einen T-Zell-vermittelten immunpathologischen Prozess darstellt, kann die verminderte GLAST-Expression um die Entzündungszellinfiltrate auch durch eingewanderte T-Zellen bedingt sein. Dass bei den TNF-transgenen Mäusen keine grundsätzlich niedrigere GLAST-Expression im Gegensatz zu wt-Mäusen vorlag, obwohl diese TNF-abhängig zu sein scheint, liegt wahrscheinlich an der moderaten TNF-Überexpression dieser Tiere, welche allein nicht ausreicht um diesen Effekt auszulösen und demnach konzentrationsabhängig zu sein scheint (MARCHETTI *et al.*, 2004). Abgesehen von den fokalen Veränderungen der Glutamattransporterexpression um die Entzündungszellinfiltrate fanden sich global betrachtet keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen bezüglich der GLT1- und GLAST-Expression im Gehirn. Dies steht im Einklang mit anderen Studien, bei welchen mittels Mikrodialyse keine Veränderungen der Proteinlevel von Glutamattransportern nach BoDV-1-Infektion von Ratten festgestellt wurden (OVANESOV *et al.*, 2007). Dagegen führt die Infektion von Mäusen mit dem *Japanese encephalitis virus* zu einer astrozytären Aufregulation von GLT1 und GLAST und damit zu einem erhöhten Schutz vor Glutamatoxizität, welcher jedoch nicht ausreicht, dass die Tiere die Virusinfektion überleben (MISHRA *et al.*, 2007). Für andere Virusinfektionen, z.B. mit dem humanen Cytomegalovirus oder vermittelt über Kontakt mit chronisch HTLV-1-infizierten T-Lymphozyten, ist eine Herunterregulation von GLT1 und GLAST *in vitro* in Astrozyten beschrieben (AKAOKA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2014). Dies wiederum kann zu Glutamatoxizität mit erhöhter Empfindlichkeit für epileptiforme Krämpfe führen, da bei GLT1-defizienten Mäusen spontan auftretende, letale epileptiforme Krämpfe beschrieben sind. All dies bestätigt, dass sich Astrozyten nach Virusinfektionen keineswegs immer einheitlich verhalten, ihr Verhalten wahrscheinlich von verschiedenen Umgebungseinflüssen, wie z.B. unterschiedlichen Zytokinleveln, abhängig ist und umgekehrt die daraufhin stattfindenden astrozytären Reaktionen, insbesondere auch im Hinblick auf die Glutamattransporterexpression, neuroprotektiv oder neurotoxisch wirken können.

5.1.5. Nachweis von Zelltod

In der hier vorliegenden Arbeit wiesen, vergleichbar mit der Studie von Schaudien (SCHAUDIEN, 2007), aktivierte Astrozyten große, degeneriert erscheinende Zellkerne mit Kernwandhyperchromasie und stark kondensiertem Chromatin auf, insbesondere bei den

BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäusen sowie u.a. auch bei der an einem generalisierten epileptiformen Krampfanfall verstorbenen TNFR2ko-Maus (siehe 5.1.3.). Diese Morphologie kann für das Vorliegen eines Zelluntergangs, wie z.B. von **Apoptose** sprechen. Eine Caspase-abhängige Apoptose spielt u.a. eine große Rolle bei Zelluntergängen im Hippocampus von Patienten mit Temporallappenepilepsie (SCHINDLER *et al.*, 2006).

In der vorhergehenden Studie von Schaudien 2007 konnte bereits gezeigt werden, dass bei den BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäusen (TNF-tg/+ und TNF-tg/tg) vornehmlich Lymphozyten und Oligodendrozyten Caspase 3- bzw. TUNEL-positiv waren und damit in Apoptose gehen (SCHAUDIEN, 2007). Die apoptotischen Zellen waren dort teilweise in der Nähe der entzündlichen Infiltrate zu finden (SCHAUDIEN, 2007). Nur vereinzelt konnten jedoch Caspase 3- bzw. TUNEL-positive Neurone und Astrozyten nachgewiesen werden, jedoch exklusive der Astrozyten mit den stark vergrößerten Zellkernen (SCHAUDIEN, 2007). Dies spricht gegen das Vorliegen von Apoptose bei diesen Astrozyten bei den TNF-transgenen Mäusen. In einer Studie von Kang *et al.* 2006 konnte im Gegensatz dazu eine Reduktion GFAP-positiver Astrozyten sowie TUNEL-positiver Astrozyten im Gyrus dentatus von Ratten bis zu 14 Tage nach Pilocarpin-induziertem Status epilepticus nachgewiesen werden, sodass es wahrscheinlich vom Stimulus abhängt, ob es zu astrozytären Apoptosen kommt (KANG *et al.*, 2006). Insgesamt wurde in der vorhergehenden Studie der eigenen Arbeitsgruppe ein statistisch hochsignifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl Caspase 3- bzw. TUNEL-positiver Zellen 42 und 49 dpi zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen festgestellt (SCHAUDIEN, 2007). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter den TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen insgesamt nur relativ wenige Caspase 3-positive Zellen nachweisbar waren und zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Mäusen sowie zwischen den Mausstämmen TNFR1ko und TNFR2ko keine statistisch signifikanten Unterschiede vorlagen. Dies kann mit den in diesen Mausgruppen nur vereinzelt vorgefundenen entzündlichen Veränderungen im Zusammenhang stehen, da Apoptosen vermehrt in der Umgebung solcher Veränderungen zu erwarten wären. Jedoch konnte zwischen den 21 und 42 Tage alten Mäusen bzw. zwischen 21 und 42 dpi ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,011$), wobei die Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen mit dem Alter bzw. der Infektionsdauer zunahm. Insbesondere die vorzeitig gestorbenen BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse und die wegen klinischer Auffälligkeiten euthanasierte TNFR1ko-Maus stachen bezüglich der Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen heraus. Diese Mäuse entsprachen auch den Tieren mit den deutlichsten entzündlichen Veränderungen. Die meisten Caspase 3-positiven Zellen bei diesen Tieren fanden sich im Bereich der entzündlichen Infiltrate, wohingegen bei den anderen TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen die Caspase 3-positiven Zellen eher zufällig über die verschiedenen Gehirnregionen verteilt waren. Unter den Caspase 3-positiven Zellen waren 7 – 8 μm große, runde Zellen mit

wenig Zytoplasma, welche Oligodendrozyten bzw. im Bereich der entzündlichen Infiltrate auch Lymphozyten entsprachen, sowie aktivierte Mikroglia und Endothelzellen. Daneben fanden sich auch einzelne positive Neurone und Astrozyten. Jedoch waren auch hier die Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen konstant Caspase 3-negativ. Dies zeigt, dass auch unter den TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen diese außergewöhnliche Kernmorphologie der Astrozyten, wie auch bei den BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäusen, nicht auf Apoptose zurückzuführen ist.

Eine weitere Form des regulierten Zelltods stellt der Caspase-unabhängige **PARP1- und AIF-vermittelte Zelltod (Parthanatos)** dar. PARP1 wird durch DNA-Strangbrüche aktiviert und kann zur Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern führen wo es dann zur DNA-Fragmentierung kommt (CULMSEE *et al.*, 2005; Übersicht bei DEGTEREV und YUAN, 2008). Dieser Zelltod scheint auch bei Epilepsie eine Rolle zu spielen, da die Inhibition von PARP1 hyperexzitatorische hippocampale Neurone vor dem Zelltod beschützt (YANG *et al.*, 2013). Die nukleäre Translokation von AIF aus den Mitochondrien kann auch durch Inhibition von Akt ausgelöst bzw. gefördert werden (AGARWAL *et al.*, 2014). Da BoDV-N eine NFκB-inhibitorische Sequenz besitzt und Akt TNFR2-vermittelt über den kanonischen Weg auch zur Aktivierung von NFκB führt, könnte umgekehrt eine BoDV-N-vermittelte Hemmung von NFκB auch Akt beeinflussen und so die nukleäre Translokation von AIF mit dadurch bedingtem Zelltod auslösen (MAKINO *et al.*, 2015; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011).

Zwischen den verschiedenen Mausstämmen (wt, TNF-tg/+, TNF-tg/tg, TNFR1ko, TNFR2ko), Altersgruppen (21 und 42 Tage) und Infektionsgruppen (nicht infiziert, Mock-infiziert, BoDV-1-infiziert) fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl AIF-positiver Zellen (= Nachweis von AIF im Zellkern). Keine der aktivierten Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen waren AIF-positiv, sodass auch diese Form des Zelltods, als mögliche Ursache für die ungewöhnliche Morphologie, ausgeschlossen werden kann. Die meisten AIF-positiven Zellen waren in den caudalen Gehirnregionen Thalamus, Cerebellum und Rhombencephalon zu finden, bei welchen es sich um kleine runde ca. 8 µm große Zellen mit dünnem Zytoplasmasaum, ohne Assoziation zu entzündlichen Veränderungen handelte. Daher handelt es sich hier am wahrscheinlichsten um Oligodendrozyten. Daneben fanden sich vereinzelte AIF-positive Neurone und Astrozyten mit physiologischer Morphologie. In Studien am Hippocampus von Patienten mit Temporallappenepilepsie spielte die nukleäre Translokation von AIF und somit der PARP1- und AIF-vermittelte Caspase-unabhängige Zelltod in Neuronen ebenfalls kaum eine Rolle (SCHINDLER *et al.*, 2006). Ein TNF-induzierter Caspase-unabhängiger AIF-vermittelter Zelltod ist bereits *in vitro* für adulte Oligodendrozyten nach einer Zugabe von 1000 U/ml TNF beschrieben (JUREWICZ *et al.*, 2005). Möglicherweise sind Oligodendrozyten besonders

prädisponiert für diese Form des Zelltods, worauf auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie hinweisen. Im Vergleich zur Studie von Jurewicz *et al.* 2005, konnten hier insgesamt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den TNF-transgenen und den wt-Mäusen festgestellt werden. Betrachtet man jedoch die Gruppe der 21 Tage alten Mäuse isoliert, ist erkennbar, dass sowohl bei den nicht infizierten als auch bei den BoDV-1-infizierten Tieren die TNF-tg/tg-Mäuse etwa doppelt so viele AIF-positive Zellen aufwiesen als die wt-Mäuse, sodass zumindest zu diesem Zeitpunkt TNF zu einer Zunahme der AIF-positiven Zellen, bei welchen es sich wahrscheinlich um Oligodendrozyten handelt, führen kann. Dies soll in weiteren Studien verfolgt werden.

Histologische Hinweise auf das Vorliegen von **Nekrose**, als klassische unprogrammierte Form des Zelltods, waren nur bei dem BoDV-1-infizierten und 29 dpi aufgrund von klinischen Auffälligkeiten euthanasierten TNFR1ko-Tier sowie bei dem 30 dpi an einem epileptiformen Krampfanfall gestorbene BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Tier festzustellen. Dabei handelte es sich bei beiden Tieren ausschließlich um Neurone in der CA3-Region des Hippocampus. Bei den aktivierten hypertrophen Astrozyten mit degeneriert erscheinenden Zellkernen fanden sich keine morphologischen Hinweise auf Einzelzellnekrosen, wie z.B. Zellkernpyknose und Verkleinerung der Zellen mit hypereosinophiler Anfärbung und Auflösung der Zellmembran. Der Hippocampus ist eine Gehirnregion, welche bei epileptischen Krämpfen oft Veränderungen aufweist, da die dortigen Neurone sowohl beim Mensch als auch beim Tier besonders anfällig für Schädigungen und damit einhergehender Nekrose infolge eines Status epilepticus sind (FORS *et al.*, 2015; HASEGAWA *et al.*, 2002; WASTERLAIN *et al.*, 1993). So sind mitochondriale Dysfunktionen und neuronaler Zelltod nach epileptischen Krämpfen im Hippocampus beschrieben (CHEN *et al.*, 2010). Neuronale Nekrosen und damit einhergehende Dendritenumstrukturierungen sind Ursachen für hippocampale Sklerose nach einem Status epilepticus, wie sie z.B. auch bei der Temporallappenepilepsie beobachtet werden (KUMAR *et al.*, 2013). Daneben haben viele virale Infektionserreger die mit der Entstehung von Krämpfen einhergehen, wie z.B. das humane Herpesvirus 6 oder TMEV, einen Tropismus für den Hippocampus (FOTHERINGHAM *et al.*, 2007; SMEAL *et al.*, 2012). So konnte bei C57BL/6-Mäusen nach TMEV-Infektion eine signifikante Erhöhung der Amplituden und der Frequenz von spontanen und miniaturen exzitatorischen Strömungen und eine Erniedrigung der Amplituden von spontanen und miniaturen inhibitorischen Strömungen in Pyramidenzellen der CA3-Region in der akuten Phase der Infektion gemessen werden (SMEAL *et al.*, 2015; SMEAL *et al.*, 2012). Interessanterweise war der Hippocampus, außer bei den oben genannten BoDV-1-infizierten TNFRko-Mäusen mit möglichen epileptiformen Krämpfen vorausgehenden klinischen Erscheinungen bzw. mit nachgewiesenem generalisiertem epileptiformem Krampf, ohne besonderen Befund bei allen anderen Mäusen.

Klinisch wurden bei den anderen Mäusen auch keine epileptiformen Krämpfe beobachtet. Bei den TNF-tg-Tieren kann das auf die protektive neuronale TNF-Überexpression, welche Schutz vor Glutamatoxizität verleiht, zurückgeführt werden, wie auch in anderen Studien gezeigt wurde (FONTAINE *et al.*, 2002; MARCHETTI *et al.*, 2004). Warum nur einzelne BoDV-1-infizierte Tiere diese morphologischen Veränderungen mit Neuronennekrosen im Hippocampus einhergehend mit klinischen Symptomen und epileptiformen Krämpfen gezeigt haben, hängt wahrscheinlich vom durch die TNF-Rezeptoren vermittelten Signalweg ab. So kommt es bei TNFR2ko-Mäusen vermehrt zu TNFR1-vermitteltem neuronalem Zelltod durch Glutamatoxizität, weil die für die Neuroprotektion wichtige persistente NFκB-Aktivierung über den TNFR2 vermittelt wird und der TNFR1 lediglich zu einer transienten NFκB-Aktivierung führt (MARCHETTI *et al.*, 2004). Bei den TNFR1ko-Mäusen hängt es möglicherweise von den TNF-Leveln im Gehirn ab, ob TNFR2-vermittelte Neuroprotektion überwiegt oder ob es möglicherweise aufgrund von Überschneidungen der Signalwege beider TNF-Rezeptoren, trotz des Fehlens des TNFR1, dennoch zu Glutamatoxizität und Neurodegeneration kommt (MARCHETTI *et al.*, 2004; Übersicht bei NAUDE *et al.*, 2011). Möglicherweise hängt es auch von zusätzlichen unbekannten äußeren Einflüssen, wie z.B. dem Stresslevel ab. Dafür spricht auch, dass in den vorhergehenden Studien der eigenen Arbeitsgruppe die epileptiformen Krämpfe vermehrt während der klinischen Untersuchungen der Mäuse, also unter erhöhtem Stresseinfluss, aufgetreten sind. Dies war hier zwar nicht der Fall, dennoch können Stressoren innerhalb der Mausgruppen in einem Käfig, wie z.B. mögliche Revierkämpfe, dazu beigetragen haben, da einzelne Tiere zuvor mit gesteigerter Aggressivität und Schreckhaftigkeit sowie mit schlechterer Gewichtsentwicklung aufgefallen sind. Für oxidativen und nitrosativen Stress im Hippocampus infolge mitochondrialer Dysfunktionen ist z.B. bekannt, dass dieser neuronalem Zelltod vorausgeht (CHEN *et al.*, 2010).

In weiteren Studien sollte abgeklärt werden, inwiefern **Nekroptose** als weitere Form des Zelltods eine Rolle bei den astrozytären Veränderungen spielt, da RIP3, als wichtiger Aktivator von Nekroptose, durch TNF und Virusinfektionen wie z.B. mit dem Vaccinia-Virus aktiviert wird (CHO *et al.*, 2009). In der hier vorliegenden Studie wurde dies aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers für die Immunhistochemie nicht weiter untersucht.

5.2. IN VITRO UNTERSUCHUNGEN

5.2.1. Nachweis von GFAP und BoDV-N in den Astrozytenkulturen

Um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte im MTT-Assay und in der Immunfluoreszenz Effekte von Astrozyten sind, wurden die Zellkulturpräparationen mittels

GFAP-Immunfluoreszenz auf den Anteil der Astrozyten untersucht. Dieser Anteil lag bei allen Astrozyten aus den verschiedenen Mausstämmen durchschnittlich bei 96 – 98 %. Diese hohe Reinheit der Astrozytenkulturen ist vergleichbar mit vorhergehenden Studien an primären kortikalen Astrozytenkulturen von Ratten und Mäusen (AHLEMEYER *et al.*, 2013; KEHR, 2016; SCHWARTZ and WILSON, 1992).

Bei den Astrozytenpräparationen aus den verschiedenen Mausstämmen wurde weiterhin mittels **BoDV-N**-Immunfluoreszenz die BoDV-1-Infektionsrate nach der ersten Passage der Zellen 8 – 12 DIV bzw 6 – 10 dpi bestimmt. Diese lag bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten insgesamt durchschnittlich bei 2,4 – 5 %. Bei BoDV-1-infizierten primären kortikalen Astrozytenkulturen aus Lewis-Ratten ist 14 dpi eine Infektionsrate von < 30 % beschrieben, in neuroglialen Mischkulturen aus Lewis-Ratten liegt die Infektionsrate von Astrozyten 8 dpi sogar bereits bei 50 % unter Verwendung einer Ratten-adaptierten Virussuspension mit vergleichbarem Titer wie der hier verwendeten mausadaptierten Virussuspension (KEHR, 2016; LENNARTZ *et al.*, 2016). Die Infektionsrate von primären Astrozytenkulturen aus C57BL/6-Mäusen ist also deutlich niedriger als die Infektionsrate von Rattenastrozyten. Insgesamt scheinen also die Tierart, die Viruspräparation und v.a. auch die Zusammensetzung der Zellkulturen (reine Astrozytenkulturen oder neurogliale Mischkulturen) einen Einfluss auf die BoDV-1-Infektionsrate zu haben. Dies ist wahrscheinlich durch die engen Wechselwirkungen zwischen Neuronen, Astrozyten und auch Mikroglia bedingt. Da BoDV-1-infizierte Neurone in neuroglialen Mischkulturen Astrozyten aktivieren, welche dann wiederum Mikroglia aktivieren, bedingt möglicherweise die Abgabe verschiedener löslicher Stoffe von den anderen Zellen, wie z.B. Neurotransmitter oder Zytokine, sowie der aktivierte Zustand der Astrozyten eine schnellere und bessere Virusaufnahme und -weitergabe (OVANESOV *et al.*, 2008a). *In vivo* kann die Mikrogliaaktivierung jedoch auch der Astrozytenaktivierung nach BoDV-1-Infektion vorausgehen (HERDEN *et al.*, 2005). Es ist also davon auszugehen, dass sich Astrozyten und Mikroglia wahrscheinlich gegenseitig aktivieren können. Interessanterweise lag die Infektionsrate der Neurone aus den neuroglialen Mischkulturen von Lewis-Ratten deutlich unter der Infektionsrate der Astrozyten, obwohl bei beiden Zelltypen von einer Glykoprotein-vermittelten Zell-zu-Zell-Ausbreitung ausgegangen wird und zellfreies Virus bei der Infektionsausbreitung keine Rolle zu spielen scheint (LENNARTZ *et al.*, 2016).

Morphologisch fanden sich zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten sowie zwischen den Astrozyten aus wt-Mäusen, im Vergleich zu Astrozyten aus TNF-tg/tg-, TNFR1ko- oder TNFR2ko-Mäusen, keine Unterschiede. Die in den *in vivo* Untersuchungen insbesondere bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen sowie zum Teil bei den klinisch auffälligen TNFR2ko-Tieren und der TNFR1ko-Maus festgestellten astrozytären

Veränderungen mit vergrößerten degeneriert erscheinenden Zellkernen und Kernwandhyperchromasie (siehe auch 4.1.2.2., 4.1.3.2. und 5.1.3.), konnten *in vitro* nicht festgestellt werden. Dies kann ebenfalls an dem fehlenden Einfluss bzw. den fehlenden Wechselwirkungen mit anderen Gehirnzellen wie Neuronen und Mikroglia liegen (siehe oben). Dies zeigt auch, dass Ergebnisse aus reinen Astrozytenkulturen nicht ohne Weiteres auf Tiermodelle übertragen werden können. Weitere Untersuchungen an neuroglialen Mischkulturen oder organotypischen *Slice*-Kulturen im Hinblick auf das Vorkommen morphologischer astrozytärer Veränderungen, vergleichbar mit den astrozytären Veränderungen *in vivo*, sollten daher angeschlossen werden.

5.2.2. MTT-Assay

Der MTT-Assay ist eine kolorimetrische Untersuchung, bei welcher das blass-gelbe Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in ein dunkelblaues Formazan umgewandelt wird bei Inkubation mit lebenden Zellen, nicht jedoch mit toten Zellen (MOSMANN, 1983). Die Umwandlung in das dunkelblaue Formazan ist auch vom Grad des Energiemetabolismus der Zelle und damit von aktiven Mitochondrien abhängig, da metabolisch inaktive Zellen, wie z.B. rote Blutkörperchen, keine Spaltung von MTT in einem signifikanten Ausmaß zur Folge haben (MOSMANN, 1983). Bei lebenden, metabolisch aktiven Zellen ist die Menge des gebildeten Formazans direkt proportional zur Anzahl der Zellen über eine relativ breite Spanne (50000 – 200 Zellen pro Well) und auch eine sehr kleine Anzahl an lebenden Zellen kann noch gut detektiert werden (MOSMANN, 1983). Die Reduktionsreaktion beim MTT-Assay wird durch Dehydrogenasen in den Mitochondrien (z.B. Succinat-Dehydrogenase) katalysiert und MTT kann auch durch die Glutathion-S-Transferase reduziert werden (MELZIG und DIENWIEBEL, 1990; YORK *et al.*, 1998). Demnach kann der MTT-Assay zur Messung verschiedener Zellparameter wie Zytotoxizität/Zellviabilität, Zellproliferation und Zellaktivierung/mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität verwendet werden (GERLIER and THOMASSET, 1986; MOSMANN, 1983).

In der hier vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von primären kortikalen Astrozyten mit **TNF** grundsätzlich zu einer statistisch hochsignifikanten ($p < 0,0001$) dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte im MTT-Assay führt, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Hierbei war der Effekt bei den Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen am wenigsten ausgeprägt. Insgesamt fanden sich zwischen den nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten statistisch hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$), obwohl nur ein geringer Prozentsatz der Zellen BoDV-1-infiziert war (siehe auch 5.2.1.). Zwischen TNF und der BoDV-1-Infektion fanden sich zudem statistisch hochsignifikante Zweifachwechselwirkungen ($p < 0,0001$). So hat die BoDV-1-Infektion insgesamt zu einer

Abschwächung des TNF-Effekts (also einer geringeren Verminderung der optischen Dichte im Vergleich zu den nicht infizierten Astrozyten) geführt. Möglicherweise sind die insgesamt hochsignifikanten Unterschiede bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten eher durch eine Aktivierung der Astrozyten zu erklären, als durch die BoDV-1-Infektion selbst. So könnte die BoDV-1-Infektion weniger Astrozyten ausreichen viele weitere (noch nicht infizierte) Astrozyten zu Aktivieren und somit ihr Verhalten im MTT-Assay zu ändern, da diese eng gekoppelte Netzwerke miteinander bilden.

Der dosisabhängige **TNF-Effekt** im MTT-Assay kann verschiedene Gründe haben. Zum einen kann er dafür sprechen, dass die TNF-Behandlung zytotoxisch wirkt und zum astrozytären **Zelltod** führt. Dafür würde z.B. sprechen, dass der Effekt bei Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen weniger ausgeprägt ist, da primär der TNFR1, welcher eine Todesdomäne im Gegensatz zum TNFR2 besitzt, lösliches TNF bindet und dadurch Apoptose induziert werden kann (FONTAINE *et al.*, 2002; GRELL *et al.*, 1998; MICHEAU and TSCHOPP, 2003). Dagegen spricht, dass morphologisch keine Hinweise auf Apoptose, wie z.B. Zellkernfragmentierung oder Ablösung der Zellen vom Untergrund des Kulturgefäßes, zu sehen waren. Mittels Immunfluoreszenz war ebenfalls kein oder nur ein marginal vermehrter Nachweis von aktivierter Caspase 3 als Apoptosemarker bei TNF-behandelten Astrozyten im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten festzustellen (siehe auch 4.2.2.3.1. und 5.2.3.). Bei humanen Astrozyten ist zudem passend dazu beschrieben, dass diese resistent gegenüber Fas-Ligand- und TRAIL-vermittelter Apoptose zu sein scheinen (SONG *et al.*, 2006).

Zum anderen ist jedoch ebenfalls möglich, dass eine veränderte **Zellproliferation** oder mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität für die dosisabhängige Reaktion der TNF-behandelten Astrozyten im MTT-Assay in Frage kommt. Es ist bekannt, dass Astrozyten auf verschiedene Stimuli wie z.B. Virusinfektionen mit reaktiver Astroglieose reagieren und dass bei der klassischen Aktivierung von Astrozyten insbesondere auch die proinflammatorische Genexpression wie z.B. von TNF aufreguliert wird (JANG *et al.*, 2013; ZLOTNIK, 1968). Dies kann sowohl mit reiner Hypertrophie der Astrozyten als auch mit einer Proliferation einhergehen (OBERHEIM *et al.*, 2008; Übersicht bei ANDERSON *et al.*, 2014). Über diesen Mechanismus könnte man die Abschwächung des TNF-Effekts bei BoDV-1-infizierten Astrozyten erklären, welche durch die Virusinfektion aktiviert werden und dadurch eine höhere optische Dichte im MTT-Assay zeigen als (gleichartig behandelte) nicht infizierte Astrozyten. Hingegen würde man über diesen Mechanismus jedoch erwarten, dass es auch durch höhere TNF-Dosen TNFR2-vermittelt zu einer Astrozytenaktivierung und damit einer Erhöhung der optischen Dichte im MTT-Assay kommt und nicht zu einer Verminderung, wie in der hier vorliegenden Studie. Gegen eine veränderte Zellproliferation als Ursache für den dosisabhängigen TNF-Effekt im MTT-Assay spricht auch, dass keine Veränderungen der PCNA-Expression bei TNF-behandelten Astrozyten im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten

festgestellt werden konnten (siehe auch 4.2.2.5. und 5.2.4.). Daher handelt es sich am wahrscheinlichsten eher um einen metabolischen Effekt, welcher in weiteren Studien abgeklärt werden sollte.

Man weiß z.B., dass TNF in Mitochondrien die Membranpermeabilität beeinträchtigen und zu Dysfunktionen der Atmungskette führen kann, was wiederum eine verminderte **Dehydrogenase-Aktivität** zur Folge haben kann und so die TNF-abhängige verminderte optischen Dichte im MTT-Assay erklären könnte (BUSQUETS *et al.*, 2003; VATTEMI *et al.*, 2013). Die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette mit darauffolgender Herunterregulation der Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität durch TNF ist bei Cardiomyozyten beschrieben (ZELL *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite ist eine Aktivierung der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase durch TNF bei verschiedenen Zelllinien beschrieben, welche einer Zytotoxizität vorausgeht (LEVRAT *et al.*, 1991). In TNF-resistenten Varianten von Zelllinien kommt es hingegen nicht zu einer Aktivierung der Succinat-Dehydrogenase durch TNF, was möglicherweise auch bei Astrozyten der Fall ist (LEVRAT *et al.*, 1991). In weiteren Untersuchungen sollte also die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Astrozyten untersucht werden. Zur Untersuchung mitochondrialer Dysfunktionen wie der Atmungskette und Glykolyse eignen sich z.B. sogenannte *Seahorse*-Messungen mit welchen die Sauerstoffverbrauchsrate und extrazelluläre Azidifikationsrate von Zellen bestimmt werden kann.

Die Behandlung der Astrozytenkulturen aus den verschiedenen Mausstämmen mit **Glutamat** hatte insgesamt betrachtet keinen eindeutigen Effekt bei den nicht infizierten Astrozyten, führte aber bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten zu einer deutlichen Zunahme der optischen Dichte im MTT-Assay. Eine Ausnahme stellten die BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen dar. Bei diesen Zellen waren nach Glutamatbehandlung keine deutlichen Abweichungen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen zu finden. Es ist aus Mikrodialysestudien an Ratten bekannt, dass BoDV-1 die extrazellulären Glutamat-Basallevel anhebt, was erklären könnte, warum es bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten zu deutlicheren Auswirkungen im Sinne einer Erhöhung der optischen Dichte im MTT-Assay, welche für eine Aktivierung sprechen kann, kommt (OVANESOV *et al.*, 2007). Die geringeren bzw. fehlenden Auswirkungen der Glutamatbehandlung bei den nicht infizierten Astrozyten können darauf zurückgeführt werden, dass Astrozyten unter physiologischen Bedingungen Glutamat über Glutamatttransporter aufnehmen und durch die Glutamin-Synthetase zu Glutamin verstoffwechseln (CHOI *et al.*, 1987; Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). Die hier verwendeten Glutamatkonzentrationen lagen mit 5 und 50 mM zwar deutlich über den physiologischen extrazellulären Glutamatkonzentrationen im Gehirn (etwa 2 μ M), dennoch konnte keine Glutamattoxizität bei Astrozyten ausgelöst werden, was ihre Schutzfunktion für

Neurone, welche sehr empfindlich auf Glutamat reagieren, belegt (Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015). Außerdem kann Glutamat selbst die Oberflächendiffusion von GLT1 auf Astrozyten erhöhen, sodass mehr Glutamat aufgenommen werden kann (AL AWABDH *et al.*, 2016). Dies konnte auch mittels Immunfluoreszenz in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, wo eine Aufregulation der GLT1-Expression von 38 % bei unbehandelten Astrozyten auf 54 % bei mit 5mM Glutamat behandelten Astrozyten festgestellt werden konnte (siehe auch 4.2.2.2. und 5.2.5.). Hohe Glutamatkonzentrationen können jedoch auch zu reaktiver Astrogliose führen, was, möglicherweise im Zusammenhang mit der Virusinfektion, die Zunahme der optischen Dichte im MTT-Assay bei den BoDV-1-infizierten und Glutamat-behandelten Astrozyten erklärt (KRAWCZYK *et al.*, 2015). Demnach scheinen BoDV-1-infizierte Astrozyten empfindlicher (im Sinne einer Aktivierung) auf Glutamat zu reagieren als nicht infizierte Astrozyten.

Die kombinierte Behandlung von Astrozyten mit **TNF und Glutamat** hatte zur Folge, dass der Effekt der TNF-dosisabhängigen Verminderung der optischen Dichte im MTT-Assay aufgehoben wurde, was statistisch einer hochsignifikanten Zweifachwechselwirkung zwischen TNF und Glutamat entsprach ($p < 0,0001$). Bei den **nicht infizierten Astrozyten** aus wt- und TNFR1ko-Mäusen war die optische Dichte der kombiniert behandelten Astrozyten größtenteils vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen. Das spricht dafür, dass Glutamat den TNF-Effekt, ggf. über den TNFR2 vermittelt, aufhebt. Bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNFR2ko-Mäusen war die optische Dichte sogar erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Hier scheint Glutamat nicht nur den TNF-Effekt aufzuheben, sondern sogar einen gegenläufigen Effekt, ggf. über den TNFR1 vermittelt, auszulösen. Das lässt sich dadurch erklären, dass über die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren auf Astrozyten, Glutamat selbst zu einer IP3-vermittelten astrozytären Glutamatexozytose führt (BEZZI *et al.*, 2004). Dieser Prozess wird durch die Anwesenheit von TNF beschleunigt und verstärkt, was wahrscheinlich über den TNFR1 vermittelt wird und eine deutlichere Glutamat-vermittelte Aktivierung der Astrozyten zur Folge hat (BEZZI *et al.*, 2004; SANTELLO *et al.*, 2011). Da lösliches TNF auch primär den TNFR1 aktiviert, weil der TNFR2 eine deutlich niedrigere Affinität für lösliches TNF hat, können so die Unterschiede zwischen den Astrozyten aus den verschiedenen Mausstämmen erklärt werden (GRELL *et al.*, 1998).

Die optische Dichte der kombiniert behandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen war dagegen weiterhin um 10 – 20 % vermindert, jedoch unabhängig von der TNF- und auch von der Glutamat-Konzentration. Hieraus kann man schlussfolgern, dass Glutamat allein bei nicht infizierten Astrozyten zwar nicht in der Lage ist die Astrozytenviabilität, Astrozytenproliferation bzw. Astrozytenaktivierung zu beeinflussen, aber in der Lage ist mit dem TNF-Effekt zu interferieren. Unter anderem wird z.B. die GLT1-Expression durch TNF aufreguliert, was die Glutamataufnahme fördert (FOCANT *et al.*, 2011). Mittels Immunfluoreszenz konnte bestätigt

werden, dass eine Behandlung von Astrozyten mit 10 ng/ml TNF die GLT1-Expression auf Astrozyten um ca. 10 % erhöht, wobei die Aufregulation von GLT1 durch Glutamat selbst deutlicher ausfiel, mit Erhöhung der GLT1-Expression um gut 15 % (siehe auch 4.2.2.2. und 5.2.5.). Hierbei sollte beachtet werden, dass in der Immunfluoreszenz-Untersuchung nicht zwischen infizierten und nicht infizierten Astrozyten unterschieden wurde. Auf der anderen Seite reduziert TNF aber auch die Glutamin-Synthetase-Expression, was eine verlangsamte Umwandlung des aufgenommenen Glutamats in Glutamin bedingt und infolge dessen die Glutamataufnahme über Glutamattransporter inhibiert (FINE *et al.*, 1996; ZOU *et al.*, 2010). Darüber hinaus passen Astrozyten ihre TNF-Produktion abhängig von der umgebenden Glutamatkonzentration an, sodass höhere Glutamatdosen zu verringerter astrozytärer TNF-Produktion führen (STELLWAGEN and MALENKA, 2006). Durch die Aktivierung von astrozytären metabotropen Glutamatrezeptoren kommt es IP3-vermittelt auch zur Abgabe von Ca^{2+} aus dem ER (Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). Erhöhte intrazytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationen wirken sich auch auf Mitochondrien aus. Diese nehmen Ca^{2+} im Rahmen ihrer Aufgabe der Ca^{2+} -Homöostase auf, was zur Stimulation von verschiedenen mitochondrialen Dehydrogenasen (u.a. der Pyruvat-Dehydrogenase), Förderung der ATP-Produktion und insgesamt zur metabolischen Aktivierung der Zelle führt (JOUAVILLE *et al.*, 1999). Daher ist es möglich, dass über diesen Mechanismus die Aktivierung mitochondrialer Dehydrogenasen und damit die Zellaktivierung gegenüber einer TNF-vermittelten Hemmung (wie bereits vorher diskutiert) überwiegt.

Bei den hier verwendeten TNF-tg/tg-Mäusen liegt eine neuronale moderate TNF-Überexpression vor, welche wiederum auch die Produktion von nativem TNF induziert (KRAMER *et al.*, 2012; MARCHETTI *et al.*, 2004; SCHAUDIEN, 2007). Sowohl Mikroglia als auch Astrozyten produzieren im Gehirn unter physiologischen Bedingungen konstitutiv TNF (Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). Die Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen sind möglicherweise präkonditioniert und bilden per se höhere Mengen an nativem TNF. Dadurch könnte erklärt werden, warum in der kombinierten Behandlung von nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen mit TNF und Glutamat, das Glutamat den TNF-Effekt im MTT-Assay weniger effektiv verhindert, da sich beide Mechanismen möglicherweise die Waage halten.

Bei der kombinierten Behandlung mit **TNF und Glutamat** von **BoDV-1-infizierten Astrozyten** zeigte sich überwiegend eine Erhöhung der optischen Dichte im MTT-Assay, auch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen, was einer statistisch signifikanten Dreifachwechselwirkung zwischen TNF, Glutamat und der BoDV-1-Infektion entspricht ($p = 0,0011$). Hier spielt wahrscheinlich die grundsätzliche Aktivierung der Astrozyten durch die Virusinfektion eine Rolle, welche zusätzlich zur Glutamat-bedingten Aktivierung, zu einem

deutlichen Gesamtüberwiegen des aktivierenden Effekts und damit zur Erhöhung der optischen Dichte im MTT-Assay führt. Zwar führt die BoDV-1-Infektion von Mäusen *in vivo* auch zu einem Anstieg an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, jedoch kommt es bei schon vorhandener neuronaler TNF-Überexpression durch die Infektion zu keiner zusätzlichen TNF-Aufregulation (KRAMER *et al.*, 2012; SCHAUDIEN, 2007). Daher unterscheidet sich das Verhalten der BoDV-1-infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen nach kombinierter Glutamat- und TNF-Behandlung nicht von dem Verhalten der anderen BoDV-1-infizierten Astrozyten im MTT-Assay.

Insgesamt weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass nicht ein Mechanismus allein für die Ergebnisse des astrozytären Verhaltens im MTT-Assay verantwortlich ist, sondern komplexe Mechanismen zusammenspielen, wobei Mechanismen welche den mitochondrialen Metabolismus wie z.B. die mitochondriale Dehydrogenase-Aktivität und damit insgesamt die Astrozytenaktivierung beeinflussen im Vordergrund zu stehen scheinen. Zur weiteren Abklärung sind hierzu weiterführende Untersuchungen der Astrozyten, z.B. die Durchführung von sogenannten *Seahorse*-Messungen nötig (siehe oben). Ebenfalls ist bemerkenswert, dass trotz der geringen Infektionsrate der Astrozyten von lediglich bis zu 5 % der Zellen (siehe 4.2.2.1. und 5.2.1.) die BoDV-1-Infektion deutliche Auswirkungen auf die Astrozyten bezüglich deren Aktivierung bzw. deren Verhalten nach TNF- und/oder Glutamatbehandlung zu haben scheint. Dies könnte z.B. dadurch bedingt sein, dass Astrozyten untereinander stark vernetzt sind und miteinander über *gap junctions* und über Glutamat-Exozytose kommunizieren (BEZZI *et al.*, 2004; TANI *et al.*, 1973). So ist es denkbar, dass über diese interzelluläre Kommunikation der Metabolismus vieler Astrozyten verändert wird, obwohl nur vereinzelte Astrozyten BoDV-1-infiziert sind. Eine Aktivierung der Astrozyten über Virus im Zellkulturüberstand ist unwahrscheinlich, da im Überstand von Astrozyten kein infektiöses Virus nachweisbar ist und auch für neurogliale Mischkulturen gezeigt wurde, dass sich BoDV-1 Glykoprotein-vermittelt von Zelle zu Zelle und nicht über Virus im Überstand ausbreitet (KEHR, 2016; LENNARTZ *et al.*, 2016). Weitere Untersuchungen die zwischen infizierten und nicht infizierten Astrozyten unterscheiden, können hier weiteren Aufschluss bringen.

5.2.3. Nachweis von Zelltod in den Astrozytenkulturen

Neben Veränderungen der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen oder der Zellproliferation kann der MTT-Assay (siehe auch 5.2.2.) auch auf Änderungen der Zellviabilität hindeuten (GERLIER and THOMASSET, 1986; MOSMANN, 1983). Es gibt verschiedene Arten von Zelltod (siehe auch 2.2.), von welchen hier drei verschiedene (Apoptose, Caspase-unabhängiger PARP1- und AIF-vermittelter Zelltod und Autophagie) bei verschiedenen Astrozyten nach TNF und/oder Glutamatbehandlung untersucht wurden (siehe auch 4.2.2.3.).

Als **Apoptosemarker** wurde aktivierte Caspase 3 verwendet, da es sich hierbei um eine Exekutions-Caspase handelt, welche sowohl beim intrinsischen als auch beim extrinsischen Apoptoseweg eine Rolle spielt (Übersicht bei KUMAR *et al.*, 2014). Insgesamt scheint für die astrozytären Reaktionen im MTT-Assay (siehe 4.2.1. und 5.2.2.) Apoptose keine Rolle zu spielen, da bei keiner der untersuchten Astrozyten der Anteil an Caspase 3-positiven Astrozyten mehr als 2 % ausmachte (siehe auch 4.2.2.3.1.). So fanden sich auch keine Unterschiede zwischen nicht infizierten und BoDV-1-infizierten Astrozyten, obwohl beschrieben ist, dass BoDV-1 über sein X-Protein den intrinsischen Apoptoseweg inhibieren kann (POENISCH *et al.*, 2009). Da Astrozyten hauptsächlich TNFR1 exprimieren war die Hypothese, dass es durch die TNF-Behandlung zur Auslösung des TNFR1-vermittelten Apoptosewegs kommt, was auch den deutlich abgeschwächten Effekt im MTT-Assay bei den TNFR1ko-Mäusen erklären würde (DOPP *et al.*, 1997). Diese Hypothese konnte jedoch widerlegt werden. Die vorliegenden Ergebnisse stehen damit im Einklang mit anderen Studien, bei welchen Astrozyten als relativ resistent gegenüber Apoptose beschrieben sind (SONG *et al.*, 2006). Möglicherweise ist eine virusbedingte Auslösung von Apoptose auch stark von der Infektionsdosis abhängig. Bei einer Infektion von Astrozyten mit St. Louis-Enzephalitis-Virus konnten z.B. Caspase 3-positive Astrozyten nur nach einer Infektion der Zellen mit höheren Viruskonzentrationen nachgewiesen werden, wohingegen es bei niedrigeren Viruskonzentrationen überwiegend zu Astrogliose mit deutlicherer GFAP-Anfärbung und vermehrten und längeren Zytoplasmafortsätzen kam (ZUZA *et al.*, 2016). Die hier untersuchten Astrozyten wurden alle gleichartig mit einer BoDV-1-Virussuspension mit einem Virustiter von 5×10^5 ID₅₀/ml infiziert. Es fanden sich jedoch auch hinsichtlich des Vorliegens von Astrogliose keine morphologischen Unterschiede zwischen den BoDV-1-infizierten und nicht infizierten Astrozyten (siehe auch 4.2.2.1. und 5.2.1.). Auch der Status des TNF-Systems per se hatte keine Auswirkungen auf die Apoptoserate, da die unbehandelten Kontrollen der Astrozyten aus den exemplarisch hier untersuchten Mausstämmen (wt, TNF-tg/tg, TNFR1ko) vergleichbar bei < 1 % lag.

Beim Caspase-unabhängigen **PARP1- und AIF-vermittelten Zelltod** kommt es zur Translokation von AIF in den Zellkern und zur DNA-Fragmentierung, sodass der Nachweis von AIF im Zellkern (= AIF-positiv) als Marker für diese Form des Zelltods verwendet wurde. Bei den nicht infizierten Astrozyten war der Anteil der AIF-positiven Zellen unabhängig von der Behandlung ≤ 1 %. Lediglich bei den BoDV-1-infizierten und mit 10 ng/ml TNF-behandelten Astrozyten aus wt-Mäusen lag der Anteil der AIF-positiven Zellen bei knapp über 2 %. Es ist beschrieben, dass es bei Unterdrückung der Caspase-Aktivierung, z.B. über NFκB, zum AIF-vermittelten Zelltod kommen kann (WANG *et al.*, 1998; ZHU *et al.*, 2007). NFκB wiederum kann sowohl über den TNFR1 als auch über den TNFR2 aktiviert werden (MARCHETTI *et al.*,

2004). Diverse Viren, einschließlich BoDV-1, können ebenfalls Apoptose inhibieren, z.B. über die Produktion von FLIP oder Bcl2 bzw. die Beeinflussung der mitochondrialen Membranpermeabilität, was den AIF-vermittelten Zelltod fördern könnte (POENISCH *et al.*, 2009; Übersicht bei BANERJEE *et al.*, 2016). Die BoDV-1-Infektion allein sowie der Status des TNF-Systems allein scheinen daher keine Auswirkungen auf die Anzahl AIF-positiver Zellen zu haben, da deren Anteil bei den unbehandelten Kontrollen der Astrozyten aus den exemplarisch untersuchten Mausstämmen (wt, TNF-tg/tg, TNFR1ko), unabhängig von der Infektion, vergleichbar bei < 1 % lag. Hingegen ist für Astrozyten nach der Infektion mit humanem Herpesvirus 6A das gleichzeitige Vorkommen von Caspase-abhängiger Apoptose als auch des Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods beschrieben (GU *et al.*, 2011). Auch oxidativer Stress kann bei Astrozyten zu diesem Zelltod führen (WANG *et al.*, 2009).

Als **Autophagiemarker** diente LC3 A/B, da dieses beim Säugetier an der Bildung der Autophagosomenmembran beteiligt ist (FLEMING *et al.*, 2011). Nach Status epilepticus ist vermehrt Autophagie mit Erhöhung der LC3-Expression im Gehirn beschrieben (BENZ *et al.*, 2014). Autophagie kann auch ausgelöst werden, wenn Apoptose inhibiert wird (SHIMIZU *et al.*, 2004). In den hier exemplarisch untersuchten Astrozyten aus wt-, TNF-tg/tg- und TNFR1ko-Mäusen, scheint Autophagie keine große Rolle zu spielen, da durchweg weniger als 2 % der Zellen LC3 A/B-positiv waren. Den einzigen Ausreißer bildeten die mit 5 mM Glutamat behandelten, nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen, bei welchen knapp 3 % der Zellen LC3 A/B-positiv waren. Autophagie tritt vermehrt bei Nährstoffmangel auf (FLEMING *et al.*, 2011). Möglicherweise kann es durch die Glutamatbehandlung und dadurch gesteigerten Zellmetabolismus zu einem verstärkten Nährstoffbedarf gekommen sein, welcher nicht ausreichend gedeckt wurde. Auch hier scheinen die BoDV-1-Infektion allein sowie der Status des TNF-Systems allein keine Auswirkungen auf die Autophagierate zu haben, da die unbehandelten Kontrollen der Astrozyten aus den exemplarisch untersuchten Mausstämmen (wt, TNF-tg/tg, TNFR1ko) unabhängig von der Infektion vergleichbar bei < 1 % lag.

5.2.4. Nachweis von Proliferation in den Astrozytenkulturen

Neben Veränderungen der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen oder der Zellviabilität kann der MTT-Assay (siehe auch 5.2.2.) auch auf Änderungen der Zellproliferation hinweisen (GERLIER and THOMASSET, 1986; MOSMANN, 1983). Als Marker diente hier der mit Zellproliferation assoziierte Nachweis von PCNA (TAKASAKI *et al.*, 1981).

Bei den nicht infizierten Astrozyten war die Menge an PCNA-positiven Zellen vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen und lag sowohl nach alleiniger TNF-Behandlung als auch nach kombinierter TNF- und Glutamatbehandlung immer um 1 %. Lediglich bei den BoDV-1-

infizierten und mit 5 mM Glutamat behandelten Astrozyten aus wt-Mäusen war die Proliferationsrate geringgradig erhöht auf knapp 2 %. Es ist beschrieben, dass sehr hohe Glutamatkonzentrationen zu reaktiver Astrogliose mit Aufregulation von GFAP und S100 β -Protein mit einhergehender Hypertrophie und Proliferation führen können, was möglicherweise hier der Fall ist, da es sich bei der verwendeten Dosis 5 mM Glutamat um eine 1000fach höhere Konzentration handelt wie sie normalerweise extrazellulär im Gehirn vorliegt (KRAWCZYK *et al.*, 2015; Übersicht bei VINTERS *et al.*, 2015).

Die BoDV-1-Infektion allein scheint keinen Einfluss auf die Proliferationsrate zu haben, da die unbehandelten BoDV-1-infizierten Astrozyten vergleichbare Proliferationsraten hatten wie die nicht infizierten unbehandelten Astrozyten. Ebenfalls war die Proliferationsrate von nicht infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen, unabhängig von der Behandlung, vergleichbar mit der Proliferationsrate von nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen, was dafür spricht, dass der Transgenstatus ebenfalls keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hat. Es ist auf der anderen Seite beschrieben, dass TNF auch zu einer Dedifferenzierung von Astrozyten zu neuronalen Vorläuferzellen, vermittelt über eine NF κ B-Aktivierung, führt, welche dann wiederum proliferieren können und sich in Neuronen und/oder Astrozyten umwandeln können (GABEL *et al.*, 2016). In der hier vorliegenden Arbeit wiesen die Astrozyten aber eine deutliche GFAP- und GLT1-Expression auf, was für differenzierte Typ 1-Astrozyten spricht (siehe auch 5.2.1. und 5.2.5.) (AHLEMEYER *et al.*, 2013; BRAMANTI *et al.*, 2010).

5.2.5. Nachweis von GLT1 und TNF-Rezeptoren in den Astrozytenkulturen

Der **Glutamattransporter 1 (GLT1)** kommt fast ausschließlich in Astrozytenmembranen vor und ist neben dem Glutamat-Aspartat-Transporter hauptverantwortlich für die Aufnahme von extrazellulärem Glutamat aus dem synaptischen Spalt (REGAN *et al.*, 2007; ROTHSTEIN *et al.*, 1994). Die GLAST-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Bezüglich der GLT1-Expression konnte exemplarisch an Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen gezeigt werden, dass es durch 5 mM Glutamatbehandlung zu einer mittelgradigen GLT1-Aufregulation sowie durch 10 ng/ml TNF-Behandlung und kombinierter Glutamat- und TNF-Behandlung zu einer geringgradigen astrozytären GLT1-Aufregulation kommt. Sowohl für TNF als auch für Glutamat ist beschrieben, dass sie zur Aufregulation von GLT1 in primären Astrozytenkulturen bzw. in Dissoziations- und *Slice*-Kulturen aus dem Gehirn führen (AL AWABDH *et al.*, 2016; DUMONT *et al.*, 2014; FOCANT *et al.*, 2011). Es ist jedoch auch beschrieben, dass TNF u.a. auch den Astrozyten-vermittelten Glutamattransport hemmt, indem es GLT1 herunterreguliert (CARMEN *et al.*, 2009; ZOU and CREWS, 2005). Dies hängt möglicherweise von weiteren Einflüssen wie zusätzlichen Virusinfektionen bzw. von der TNF-Konzentration ab. So wurde in der einen Studie der Glutamattransport nach NSV-Infektion untersucht und in der anderen Studie waren die verwendeten TNF-Konzentrationen höher (20

ng/ml versus 10 ng/ml in der vorliegenden Studie) (CARMEN *et al.*, 2009; ZOU and CREWS, 2005).

Bezüglich der **TNF-Rezeptoren** ist bekannt, dass Astrozyten überwiegend den TNFR1 exprimieren, die TNFR2-Expression jedoch durch TNF, IL-1 und IFN γ aufreguliert werden kann (CHOI *et al.*, 2005; DOPP *et al.*, 1997). Auch die TNFR1-Expression kann durch TNF selbst gesteigert werden (MEEUWSEN *et al.*, 2003). Bei den Astrozytenkulturen aus TNF-tg/tg-Mäusen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass mehr unbehandelte Astrozyten TNFR1- (knapp 8 % positive Astrozyten) als TNFR2 (gut 3 % positive Astrozyten) exprimieren. In beiden Fällen führte die Behandlung mit 5 mM Glutamat zu mehr als einer Verdopplung der TNFR1- bzw. TNFR2-positiven Astrozyten im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen. Da keine Hinweise auf Apoptose vorlagen (siehe auch 4.2.2.3.1. und 5.2.3.), hat die Glutamatbehandlung wahrscheinlich sowohl eine transiente (über den TNFR1 vermittelte) als auch eine längerfristige (über den TNFR2 vermittelte) NF κ B-Aktivierung zur Folge (MARCHETTI *et al.*, 2004). Hingegen führte die Behandlung mit 10 ng/ml TNF nur im Falle des TNFR1 zu mehr als einer Verdopplung der TNFR1-positiven Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen. Die TNF-Behandlung hatte jedoch keine Auswirkung auf die Anzahl TNFR2-positiver Astrozyten, was daran liegen kann, dass primär der TNFR1 lösliches TNF bindet (GRELL *et al.*, 1998). Es ist jedoch auch beschrieben, dass sowohl die TNFR1- als auch die TNFR2-Expression durch lösliches TNF aufreguliert wird (MEEUWSEN *et al.*, 2003). Es muss auch bedacht werden, dass mittels Immunfluoreszenz lediglich die Anzahl der TNFR2-positiven Astrozyten, jedoch nicht die Menge der TNFR2-Expression pro Astrozyt bzw. die Gesamtmenge der TNFR2-Expression bestimmt werden kann. Hierzu müssten weitere Untersuchungen, z.B. mittels Western Blot, durchgeführt werden. Der vermehrte Nachweis von TNFR1-positiven Zellen nach TNF-Behandlung hatte jedoch keine vermehrte Apoptose zur Folge (siehe auch 4.2.2.3.1. und 5.2.3.), sodass möglicherweise eine transiente NF κ B-Aktivierung vorgelegen hat (MARCHETTI *et al.*, 2004). Die kombinierte Behandlung mit TNF und Glutamat erbrachte in beiden Fällen keine erhöhte Anzahl an TNFR1- bzw. TNFR2-positiven Astrozyten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Dies impliziert, dass sich die Effekte von Glutamat und TNF auf Astrozyten möglicherweise gegenseitig inhibieren oder es durch die zusätzliche Gabe von TNF zu einer Rezeptorinternalisierung kommt. Das würde auch zu den Ergebnissen des MTT-Assays passen, bei welchen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass Glutamat und TNF sich gegenseitig beeinflussen/inhibieren (siehe auch 5.2.2.).

5.3. VERGLEICHENDE BETRACHTUNG DER *IN VIVO* UND *IN VITRO* UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

5.3.1. Astrozytärer Zelltod und Zellproliferation

Hinsichtlich des Vorkommens verschiedener Arten von **Zelltod** wurden in den *in vivo* Untersuchungen die Gehirne auf das Vorliegen von Apoptose und des Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods von Astrozyten untersucht. In den *in vitro* Untersuchungen wurden die primären kortikalen Astrozytenkulturen hinsichtlich des Vorliegens von Apoptose, des Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods sowie von Autophagie untersucht. Insgesamt konnte nur ganz vereinzelt Apoptose bzw. der PARP1- und AIF-vermittelte Zelltod bei Astrozyten *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden, weshalb diese Arten von Zelltod keine Rolle bei Astrozyten unter den hier vorliegenden Versuchsbedingungen zu spielen scheinen. Auch die Infektion mit BoDV-1 führte zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen bezüglich des Vorkommens von Zelltod *in vivo* und *in vitro*. Es muss jedoch bedacht werden, dass bei den hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen auch nur maximal 5 % der Astrozyten BoDV-1-infiziert waren. Daher ist es empfehlenswert in weiteren Studien Untersuchungen an Astrozyten mit höheren Infektionsraten durchzuführen bzw. zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen bei der Untersuchung auf das Vorliegen verschiedener Zelltodformen, z.B. mit Hilfe von Doppelmarkierungen, zu unterscheiden. In vorhergehenden Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an BoDV-1-infizierten TNF-transgenen Mäusen fanden sich ebenfalls keine Hinweise darauf, dass Apoptose eine größere Rolle bei Astrozyten unter diesen Bedingungen spielt (SCHAUDIEN, 2007).

Bezüglich der astrozytären **Zellproliferation** wurden *in vivo* die Gehirne der nicht infizierten, Mock-infizierten und BoDV-1-infizierten Mäuse immunhistologisch auf das Vorhandensein GFAP-positiver Astrozyten semiquantitativ untersucht. Dort konnte gezeigt werden, dass sowohl die BoDV-1-Infektion, als auch erhöhte TNF-Level, als auch das Alter bzw. die Infektionsdauer der Mäuse zu einer erhöhten Anzahl GFAP-positiver Astrozyten führte und die astrozytäre Zellproliferation gefördert wurde. Dabei wirkten die einzelnen Komponenten additiv aufeinander, sodass z.B. die TNF-transgenen BoDV-1-infizierten Mäuse hochsignifikant mehr GFAP-positive Zellen aufwiesen als die TNF-transgenen nicht infizierten Mäuse oder die BoDV-1-infizierten wt-Mäuse gleichen Alters. Neben einer erhöhten Anzahl GFAP-positiver Zellen kam es weiterhin zu einer zunehmenden Vergrößerung der astrozytären Zellkerne durch oben genannte Einflüsse. Sowohl die Vergrößerung der Zellkerne als auch die erhöhte Anzahl GFAP-positiver Astrozyten belegen das Vorliegen einer reaktiven Astroglie, die mit

Veränderungen der Genexpression einhergeht (EDDLESTON and MUCKE, 1993; PANG *et al.*, 2001; ZLOTNIK, 1968). Bei der klassischen Aktivierung (M1-Polarisierung) wird vor allem die proinflammatorische Genexpression wie z.B. von TNF und LCN2 aufreguliert, wohingegen bei der alternativen Aktivierung (M2-Polarisierung) vor allem die anti-inflammatorische Genexpression wie z.B. von Arginase 1 aufreguliert wird (JANG *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2009). Bezüglich der Bestimmung der Art der Aktivierung sind weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der aufregulierten Genexpression nötig.

In den *in vitro* Untersuchungen wurden die Astrozytenkulturen hinsichtlich ihrer Proliferationsrate mit Hilfe des Nachweises von PCNA untersucht. Entgegen den *in vivo* Ergebnissen, fanden sich bei den hier exemplarisch durchgeführten Untersuchungen keine Hinweise auf das Vorliegen einer erhöhten Proliferationsrate in Abhängigkeit vom Mausstamm bzw. Infektionsstatus. Weder bei unbehandelten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Astrozyten aus wt-Mäusen, noch bei unbehandelten BoDV-1-infizierten Astrozyten im Vergleich zu unbehandelten nicht infizierten Astrozyten war diese erhöht. Dies kann damit im Zusammenhang stehen, dass zur Proliferation weitere Einflussfaktoren wie z.B. Neurotransmitter- oder Zytokinabgaben von Neuronen und Mikroglia nötig sind, welche *in vivo* eng mit den Astrozyten vernetzt sind (sogenannte „Tripartite Synapsen“; siehe auch Abb. 2 und 3) und sich gegenseitig stark beeinflussen (Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). So kommt es infolge pathologischer Stimuli z.B. nicht nur bei den Astrozyten selbst, sondern auch bei Mikroglia und bei ggf. vorhandenen infiltrierenden Immunzellen zu einer Steigerung der TNF-Produktion, welche dann wiederum die reaktive Astroglie mit einhergehender astrozytärer Proliferation verstärken kann (SANTELLO *et al.*, 2011; SRIRAM and O'CALLAGHAN, 2007). Diese Einflüsse anderer Zellen des ZNS fehlen in dem hier verwendeten *in vitro* System. Zur Überprüfung der Einflüsse anderer Zellen *in vitro* sind weitere Untersuchungen z.B. an neuroglialen Mischkulturen oder organotypischen *Slice*-Kulturen nötig.

5.3.2. Glutamatsystem

In vivo zeigten die Mäuse mit verändertem TNF-System insgesamt eine statistisch signifikant stärkere Glutamattransporterexpression (GLT1 und GLAST) als die wt-Mäuse, wobei der Unterschied bei den 42 Tage alten Mäusen ausgeprägter war als bei den 21 Tage alten Tieren. In den *in vitro* Versuchen wurden exemplarisch nur die Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen hinsichtlich der GLT1-Expression untersucht, bei welchen sowohl durch die Behandlung mit Glutamat als auch mit TNF eine mittel- bzw. geringgradige Zunahme der GLT1-Expression vorlag. Sowohl die *in vivo* als auch die *in vitro* Untersuchungen deuten auf ein enges Zusammenspiel des Glutamat- und TNF-Systems hin, da in beiden Fällen eine Veränderung des TNF-Systems (sowohl endogen als auch exogen) die GLT1-Expression und damit das

Glutamatsystem beeinflusst hat. Auch im MTT-Assay wurde diese gegenseitige Beeinflussung bestätigt, da die kombinierte Behandlung der Astrozyten mit TNF und Glutamat unterschiedliche Reaktionen zur Folge hatte als die alleinige TNF-Behandlung. Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass Astrozyten äußerst resistent gegenüber selbst sehr hohen Glutamatdosen sind, unabhängig von einer Virusinfektion. Dies ist nicht ungewöhnlich, da eine wesentliche Rolle von Astrozyten im ZNS die Aufnahme von Glutamat und Umwandlung von Glutamat in Glutamin zum Schutz von Neuronen vor Glutamatergischer Toxizität ist (CHOI *et al.*, 1987; ROTHSTEIN *et al.*, 1996; Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007). Dieser Prozess wird auf verschiedenen Ebenen von TNF beeinflusst, welches z.B. die Glutamin-Synthetase-Expression reduziert (FINE *et al.*, 1996; ZOU *et al.*, 2010). Es sind viele verschiedene Wechselwirkungen zwischen TNF und Glutamat im ZNS beschrieben (siehe auch Abb. 3), bei welchen Astrozyten mit ihren vielfältigen Aufgaben im Gehirn (siehe auch 2.1.) eine zentrale Rolle spielen (Übersicht bei VERKHRATSKY and KIRCHHOFF, 2007 und VINTERS *et al.*, 2015).

5.3.3. TNF-System

In vivo führte ein verändertes TNF-System nach Virusinfektion zu deutlichen Veränderungen im Gehirn und insbesondere auch in den Astrozyten. So zeigten BoDV-1-infizierte TNF-tg/tg-Mäuse hochsignifikant mehr entzündliche Veränderungen als BoDV-1-infizierte wt-Mäuse. Ebenfalls traten epileptiforme Krämpfe oder klinische Veränderungen, welche für bevorstehende Krämpfe sprechen können, ausschließlich bei Mäusen mit verändertem TNF-System auf. Veränderungen des TNF-Systems führten zu einer stärker ausgeprägten reaktiven Astroglie nach BoDV-1-Infektion, wie bei den TNF-tg/tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen gezeigt werden konnte.

Im Gegensatz dazu führte *in vitro* die Behandlung von Astrozytenkulturen mit TNF zu einer dosisabhängigen verminderten optischen Dichte im MTT-Assay, was für eine verminderte Aktivierung sprechen kann, sowie zu einer Erhöhung der TNFR1-, nicht jedoch der TNFR2-Expression.

In einer vorhergehenden Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits eine Zunahme beider TNF-Rezeptoren bei BoDV-1-infizierten Mäusen festgestellt, welche bei TNF-transgenen Tieren deutlich ausgeprägter war (SCHAUDIEN, 2007). Bei den positiven Zellen handelte es sich dort jedoch vornehmlich um Neurone und nur vereinzelt um Astrozyten (SCHAUDIEN, 2007). Dennoch zeigt dies, dass TNF beide Rezeptoren *in vivo* aufzuregulieren scheint, was nicht mit Apoptose und demnach eher mit einer NFkB-Aktivierung einherzugehen scheint, welche wiederum eine reaktive Astroglie bedingen kann. Dafür sprechen auch die Ergebnisse vorhergehender *in vivo* Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe, welche zeigten, dass die Expression von NFkB bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg/tg-Mäusen bereits

21 dpi signifikant höher war im Vergleich zu den nicht infizierten Mäusen (SCHAUDIEN, 2007). Bei den nicht infizierten Mäusen waren vor allem Neurone NFκB-positiv, hingegen waren bei den BoDV-1-infizierten Mäusen zusätzlich auch Astrozyten, Oligodendrozyten, infiltrierende Lymphozyten und Endothelzellen positiv (SCHAUDIEN, 2007). Die Unterschiede zwischen den *in vivo* und *in vitro* Reaktionen in der hier vorliegenden Arbeit sind am wahrscheinlichsten darauf zurückzuführen, dass es sich bei dem hier verwendeten *in vitro* System um reine Astrozytenkulturen handelt, bei welchen der Einfluss anderer Zellen des ZNS, insbesondere von Neuronen und Mikroglia, wegfällt. Insbesondere Mikroglia stellen eine große TNF-Quelle dar und können daher wesentlich an der Umschaltung von regulatorischen zu schädlichen TNF-Wirkungen beitragen, da hohe TNF-Dosen die astrozytäre Glutamatabgabe verstärken, was prädisponierend für epileptiforme Krämpfe sein kann (BEZZI *et al.*, 2001; Übersicht bei SANTELLO and VOLTERRA, 2012). Auch bei Mikroglia gibt es eine funktionielle Polarisierung und je nach Stimulus kann es zu proinflammatorischer (M1-Polarisierung) oder alternativer/anti-inflammatorischer Aktivierung (M2-Polarisierung) kommen (JHA *et al.*, 2016). Im Vergleich belegen die Untersuchungen, dass die Effekte des TNF-Systems sehr stark von Umgebungsfaktoren wie der Interaktion mit anderen Gehirnzellen und Stoffen wie z.B. Glutamat beeinflusst werden können. Daher sollten weiterführende *in vitro* Untersuchungen an Mischkulturen oder organotypischen *Slice*-Kulturen sowie an primären Astrozytenkulturen, die eine höhere Infektionsrate aufweisen, angeschlossen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

6.1. Zusammenfassung

Pathogenese epileptiformer Krämpfe bei TNF-transgenen Mäusen nach *Borna disease virus*-Infektion: Rolle von astroglialen Dysfunktionen

Manuela Hirz

1. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung astroglialer Dysfunktionen unter dem Einfluss eines veränderten TNF-Systems und zusätzlicher Infektion mit dem neurotrophen *Borna disease virus* (BoDV-1). Weiterhin sollte geklärt werden, wie astrogliale Dysfunktionen zur Pathogenese epileptiformer Krämpfe beitragen können. Es war bekannt, dass das Modell der neonatalen BoDV-1-Infektion TNF-transgener (TNF-tg) Mäuse zu einer TNF-Level-abhängigen progredienten nicht-eitrigen Meningoenzephalitis mit neurologischen Symptomen bis hin zu generalisierten finalen epileptiformen Krämpfen führt. Bei diesen Mäusen wurde bei Astrozyten eine ausgeprägte Hypertrophie mit stark vergrößerten und teilweise degeneriert erscheinenden Zellkernen festgestellt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob es sich bei den astrozytären Veränderungen um eine Form des Zelltods oder um eine bisher nicht bekannte Form von reaktiver Astrogliose handelt. Hierzu wurden BoDV-1-infizierte TNF-tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse verwendet. Weiterhin sollten Hinweise auf mögliche zugrunde liegende funktionelle Störungen anhand von *in vitro* Modellen gewonnen werden. Hierzu wurden primäre kortikale Astrozyten aus wt-, TNF-tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen unter dem kombinierten Einfluss von verschiedenen hohen TNF- und/oder Glutamatdosen und der BoDV-1-Infektion untersucht und mit *in vivo* Daten verglichen.

2. Die wt-, TNF-tg/+, TNF-tg/tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse wurden regelmäßig klinisch untersucht mit der Hypothese, dass im Vergleich zu den TNF-tg-Tieren, die BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäuse eine deutlich erhöhte Krampfanfälligkeit mit deutlich verstärkten entzündlichen und astrozytären Veränderungen und die BoDV-1-infizierten TNFR1ko-Mäuse eine erhöhte Resistenz demgegenüber zeigen. Weiterhin wurden die Gehirne der Mäuse histologisch auf entzündliche Veränderungen und Astrozytenaktivierung/morphologische Astrozytenveränderungen sowie die GFAP-Expression mittels Immunhistologie im Vergleich zwischen nicht infizierten, Mock-infizierten und BoDV-1-infizierten Tieren untersucht. Bei keiner der BoDV-1-infizierten wt-, TNF-tg/+ oder TNF-tg/tg-Mäuse waren klinisch

epileptiforme Krämpfe nachweisbar. In vorhergehenden Studien der eigenen Arbeitsgruppe waren diese bei den TNF-tg/+ -Mäusen ab 42 dpi und bei den TNF-tg/tg-Mäusen ab 21 dpi zu finden (KRAMER, 2006; KRAMER *et al.*, 2012). Es kam jedoch bei einer BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Maus 30 dpi zu einem finalen generalisierten epileptiformen Krampf und bei zwei weiteren BoDV-1-infizierten TNFR2ko-Mäusen 40 und 37 dpi zu Todesfällen sowie bei einer TNFR1ko-Maus 29 dpi zum Versuchsabbruch mit zuvor aufgetretenen klinischen Anzeichen, die auf ein epileptiformes Krampfgeschehen hinweisen können. Nur die TNF-tg-Tiere entwickelten eine typische nicht-eitrige Meningoenzephalitis und die astrozytären Veränderungen wie in vorhergehenden Studien der eigenen Arbeitsgruppe (KRAMER *et al.*, 2012). Dagegen war nur bei den klinisch auffälligen TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen eine gleichartige nicht-eitrige Meningoenzephalitis mit zum Teil einhergehenden astrozytären Veränderungen wie bei den BoDV-1-infizierten TNF-tg-Tieren zu finden.

Bei den wt-, TNF-tg/+ und TNF-tg/tg-Mäusen konnten statistisch hochsignifikante Unterschiede bezüglich des Auftretens und der Stärke der entzündlichen Veränderungen sowie der Astrozytenaktivierung und GFAP-Expression festgestellt werden. Diese nahmen bei den BoDV-1-infizierten Mäusen jeweils mit dem Alter bzw. der Dauer der Infektion und der Menge der TNF-Überexpression zu. Bei keiner der nicht infizierten bzw. Mock-infizierten Tiere traten hingegen entzündliche Veränderungen oder Aktivierung der Astrozyten auf. Daneben fanden sich zwischen Mausstamm, Alter/Dauer der Infektion und Infektionsstatus statistisch hochsignifikante Wechselwirkungen, was bestätigt, dass sich alle Parameter gegenseitig beeinflussen. Die BoDV-1-infizierten 42 Tage alten TNF-tg/tg-Mäuse wiesen die stärksten entzündlichen Veränderungen, die meisten GFAP-positiven Astrozyten sowie die deutlichste astrozytäre Hypertrophie mit z.T. vergrößerten, degeneriert erscheinenden Zellkernen auf. Dies war vergleichbar mit den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe. Eine vermehrte Anzahl GFAP-positiver Astrozyten, z.T. mit vergrößerten Zellkernen, fand sich jedoch auch bei den BoDV-1-infizierten TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen 42 dpi, unabhängig von entzündlichen Veränderungen.

Es kann also abgeleitet werden, dass sowohl die BoDV-1-Infektion, als auch das TNF-System einen Einfluss auf die Entwicklung der entzündlichen und astrozytären Veränderungen haben. *In vitro* konnte mittels GFAP-Immunfluoreszenz jedoch kein Einfluss der BoDV-1-Infektion oder des TNF-Systems auf das Auftreten der *in vivo* beschriebenen morphologischen astrozytären Veränderungen festgestellt werden.

Entgegen der primären Hypothese, waren die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen an den BoDV-1-infizierten TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen vergleichbar, was möglicherweise mit Wechselwirkungen zwischen den TNFR1- und TNFR2-Signalwegen zusammenhängt.

3. Zum Nachweis möglicher Zelltodformen wurden v.a. die hypertrophen Astrozyten *in vivo* auf das Vorkommen von aktivierter Caspase 3 zum Nachweis von Apoptose bzw. von AIF in den Zellkernen zum Nachweis des Caspase-unabhängigen PARP1- und AIF-vermittelten Zelltods untersucht. Ergänzend dazu wurden mit TNF und/oder Glutamat vorbehandelte nicht infizierte und BoDV-1-infizierte Astrozyten *in vitro* auch auf LC3 A/B zum Nachweis von Autophagie exemplarisch untersucht. Insgesamt war keine der untersuchten Zelltodformen *in vivo* oder *in vitro* bei den Astrozyten vermehrt nachzuweisen. Daher sind die astrozytären Veränderungen in den Gehirnen der BoDV-1-infizierten TNF-tg-, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse nicht auf einen der untersuchten Zelluntergänge zurückzuführen. Hinsichtlich des Vorkommens von Apoptose, fanden sich zwischen den TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des Alters der Tiere bzw. der Dauer der Infektion. So zeigten die älteren bzw. länger infizierten Mäuse mehr apoptotische Zellen als die jüngeren bzw. kürzer infizierten Mäuse. Vor allem die gestorbenen TNFR2ko-Mäuse sowie die euthanasierte TNFR1ko-Maus wiesen vermehrt apoptotische Zellen auf. Dabei handelte es sich vor allem um Zellen mit Lymphozytenmorphologie in der Umgebung der Entzündungszellinfiltrate unter Beteiligung von Mikroglia, vereinzelt Neuronen und nur ganz vereinzelt (morphologisch unauffälligen) Astrozyten. In den Astrozytenkulturen lag der Anteil an apoptotischen Astrozyten, unabhängig von der Glutamat- oder TNF-Vorbehandlung oder dem Infektionsstatus, unter 2 %. Der nukleäre Nachweis von AIF fand sich *in vivo* bei allen untersuchten Tiergruppen vor allem in den caudalen Gehirnregionen Thalamus, Rhombencephalon und Cerebellum in Zellen mit Oligodendrozytenmorphologie und unabhängig von entzündlichen Veränderungen. In allen untersuchten Astrozytenkulturen lag der Anteil an Astrozyten mit AIF im Zellkern unter 1 %, lediglich bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten aus wt-Mäusen kam es durch TNF-Behandlung zu einer Zunahme auf knapp über 2 %. Die Autophagierate der untersuchten Astrozytenkulturen lag durchweg bei unter 2 %, lediglich die mit Glutamat behandelten nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen zeigten einen geringgradigen Anstieg auf knapp 3 %. Inwiefern dies und die vereinzelt erhöhte AIF-vermittelte Zelltodrate durch die entsprechenden Vorbehandlungen und/oder die BoDV-1-Infektion im Fall von AIF bedingt sind, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Ebenso sollte in weiterführenden Untersuchungen das Vorkommen von Nekroptose *in vivo* und *in vitro* abgeklärt werden.

4. Der Einfluss des TNF- und Glutamatensystems auf die BoDV-1-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen wurde mittels MTT-Assay anhand von Glutamat- und/oder TNF-behandelten Astrozyten aus wt-, TNF-tg/tg, TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen untersucht. Zusätzlich wurde *in vivo* und exemplarisch auch *in vitro* die Glutamattransporterexpression untersucht. Der Einfluss der TNF-Rezeptoren wurde durch das Verwenden der bereits

genannten TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäuse näher beleuchtet und deren Expression exemplarisch *in vitro* an Astrozytenkulturen untersucht.

Bei der Glutamattransporterexpression *in vivo* lag bei keiner Mausgruppe ein statistisch signifikanter Einfluss der BoDV-1-Infektion vor. Zwischen den verschiedenen Mausstämmen und bei der GLAST-Expression auch zwischen den Altersgruppen 21 und 42 Tage fanden sich jedoch insgesamt statistisch signifikante Unterschiede. Dies weist auf eine altersabhängige Zunahme der GLAST-Expression sowie auf einen Einfluss des TNF-Systems auf die Glutamattransporterexpression hin. Die GLT1-Expression war bei den Mäusen mit verändertem TNF-System insgesamt zu beiden Zeitpunkten erhöht, im Fall von GLAST bei den TNFR1ko- und TNFR2ko-Mäusen jedoch niedriger als bei den TNF-tg/tg- und wt-Mäusen, v.a. mit 42 Tagen/42 dpi. Daneben beeinflussen die entzündlichen Veränderungen die Glutamattransporterexpression, welche in unmittelbarer Umgebung der Entzündungszellinfiltrate häufig herabgesetzt war. Glutamat hatte insgesamt, selbst in sehr hohen Dosen, keinen Effekt auf die nicht infizierten Astrozyten im MTT-Assay, hingegen kam es mehrheitlich bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten zu einer Aktivierung der Astrozyten. Exemplarisch Glutamat- und/oder TNF-behandelte Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen zeigten eine gering- bis mittelgradige GLT1-Aufregulation, wie auch *in vivo*.

Mittels MTT-Assay wurde nach TNF-Behandlung eine dosisabhängige Verringerung der optischen Dichte, sowohl bei den nicht infizierten als auch bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten, festgestellt, mit Ausnahme der Astrozyten aus TNFR1ko-Mäusen. Bei diesem Effekt handelte es sich nicht um Zelltod, wie anhand der Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zum Nachweis verschiedener Zelltodformen geschlussfolgert werden konnte, noch lagen Unterschiede in der Proliferationsrate mittels PCNA-Untersuchung vor. Aus diesem Grund ist von einer Veränderung der Zellaktivierung bzw. der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität als Ursache für die Effekte im MTT-Assay auszugehen, was jedoch durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden sollte.

Es wurde auch gezeigt, dass sich das TNF- und Glutamatsystem bezüglich ihrer Effekte auf die Astrozyten gegenseitig beeinflussen, da der dosisabhängige TNF-Effekt im MTT-Assay durch kombinierte Behandlung mit Glutamat bei allen Astrozytenkulturen aufgehoben wurde. Bei den BoDV-1-infizierten Astrozyten lag sogar mehrheitlich eine Aktivierung vor. Nur bei den nicht infizierten Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen war weiterhin eine Verringerung der optischen Dichte, unabhängig von der TNF-Dosis, zu sehen. Dies kann auf eine TNF-Präkonditionierung der Astrozyten durch die TNF-Überexpression zurückzuführen sein. Im Vergleich zu den nicht infizierten Astrozyten, hatten die BoDV-1-infizierten Astrozyten mehrheitlich, unabhängig von der Behandlung, eine höhere optische Dichte, was für einen generell aktivierenden Effekt der Infektion spricht. Dies unterstreicht die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen, welche ebenfalls darauf hindeuten, dass es sich bei den ungewöhnlichen

hypertrophen Astrozyten in BoDV-1-infizierten Mäusen um eine bisher nicht beschriebene Form der Aktivierung/reaktiven Astrogliose handelt. Diese sollte in weiteren Untersuchungen näher charakterisiert werden.

Die Expression der TNF-Rezeptoren ergab *in vitro* an Astrozyten aus TNF-tg/tg-Mäusen, dass sowohl die Behandlung mit Glutamat als auch mit TNF zu einer Verdopplung TNFR1-positiver Astrozyten führt, wobei die TNFR2-Expression nur durch Glutamat induziert wurde. Insgesamt waren auch nur halb so viele Astrozyten TNFR2- als TNFR1-positiv, was dafür spricht, dass die gefundenen TNF-Effekte im MTT-Assay primär über den TNFR1 vermittelt werden.

5. Zusammenfassend ist es sehr wahrscheinlich, dass die vorliegenden astrozytären Dysfunktionen/Veränderungen in den untersuchten Mausmodellen eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese epileptiformer Krämpfe spielen und es sich bei diesen nicht um die untersuchten Zelluntergangsformen, sondern um eine bisher nicht bekannte Form der Astrozytenaktivierung/reaktiven Astrogliose handelt. Diese kann mit unterschiedlichen Expressionsprofilen z.B. der Glutamattransporter und TNF-Rezeptoren einhergehen, wie *in vitro* Untersuchungen an primären kortikalen Astrozytenkulturen zeigten. Diese Astrozytenaktivierung ist sowohl von TNF als auch von der BoDV-1-Infektion abhängig, wobei die BoDV-1-Infektion diese sowohl *in vivo* als auch *in vitro* fördert. Hingegen fördern erhöhte TNF-Level diese nur *in vivo*, eine TNF-Behandlung *in vitro* induziert jedoch keine Astrozytenaktivierung. Die typischen morphologischen astrozytären Veränderungen, wie sie *in vivo* festgestellt wurden, waren *in vitro*, unabhängig von der BoDV-1-Infektion oder dem Mausstamm, ebenfalls nicht zu finden. Diese Unterschiede können auf die zelluläre Zusammensetzung zurückzuführen sein (gesamtes Gehirn versus reiner Astrozytenkultur), was zeigt, dass die Wechselwirkungen von Astrozyten mit anderen Gehirnzellen wie Mikroglia und Neuronen einen wesentlichen Einfluss auf die Morphologie und Funktion der Astrozyten hat. Weiterhin weist dies darauf hin, dass Ergebnisse aus zellulär einheitlichen *in vitro* Systemen nicht immer uneingeschränkt auf *in vivo* Systeme übertragbar sind.

Weiterführend wäre es sinnvoll den Metabolismus v.a. von mitochondrialen Enzymen wie die Glutamin-Synthetase-Expression sowie die genaue Art der Astrozytenaktivierung (proinflammatorische oder alternative/anti-inflammatorische Aktivierung) zu untersuchen und sich dafür verschiedener Systeme zu bedienen, wie z.B. Astrozytenkulturen, neuroglialen Mischkulturen oder organotypischen *Slice*-Kulturen. Astrozyten stellen eine wichtige Schnittstelle zwischen dem TNF- und Glutamatsystem und Neuronen sowie Mikroglia dar, weswegen die Modulation ihrer Aktivierung im Rahmen der Pathogenese epileptiformer Krämpfe eine zukünftige Therapiemöglichkeit für Epilepsie darstellen könnte.

6.2. Summary

Pathogenesis of epileptiformic seizures in TNF-transgenic mice after *Borna disease virus* infection: Role of astroglial dysfunctions

Manuela Hirz

1. The aim of this study was the characterization of astroglial dysfunctions under the influence of an altered TNF-system with concurrent infection with the neurotropic *Borna disease virus* (BoDV-1). Furthermore, the aim was to clarify how astroglial dysfunctions contribute to the pathogenesis of epileptiformic seizures. It was known that the model of neonatal BoDV-1-infection of TNF-transgenic (TNF-tg) mice leads to a TNF-level-dependent progredient non suppurative meningoencephalitis with neurological symptoms, which can lead up to generalized epileptiformic seizures. In these mice, marked astrocytic hypertrophy with severely enlarged and partially degenerate-appearing nuclei was found. Hence, the present study was carried out to clarify whether these astrocytic changes present a form of cell death or a so far unknown form of reactive astrogliosis. For this purpose, BoDV-1-infected TNF-tg-, TNFR1ko- and TNFR2ko-mice were used. Furthermore, possible underlying functional defects were analyzed using respective *in vitro* models. Primary cortical astrocytes from wt-, TNF-tg/tg-, TNFR1ko- and TNFR2ko-mice were used and examined under the combined influence of different doses of TNF and/or glutamate with concurrent BoDV-1-infection and compared with the *in vivo* data.

2. The wt-, TNF-tg/+-, TNF-tg/tg-, TNFR1ko- and TNFR2ko-mice were clinically examined on a regular basis with the hypothesis, that, compared to the TNF-tg-mice, the BoDV-1-infected TNFR2ko-mice show a markedly elevated seizure susceptibility with distinctly enhanced inflammatory and astrocytic changes and the BoDV-1-infected TNFR1ko-mice show an enhanced resistance against this. Furthermore the mice brains were histologically evaluated concerning inflammatory changes and activation of astrocytes/morphological astrocytic changes as well as GFAP-expression using immunohistochemistry, comparing non infected, mock-infected and BoDV-1-infected animals. In none of the BoDV-1-infected wt-, TNF-tg/+-, or TNF-tg/tg-mice epileptiformic seizures could be detected. In the preceding studies, those could be found in TNF-tg/+-mice from 42 dpi and in TNF-tg/tg-mice from 21 dpi on. However, one BoDV-1-infected TNFR2ko-mouse died 30 dpi from a generalized epileptiformic seizure and two other BoDV-1-infected TNFR2ko-mice died 40 and 37 dpi as well as one TNFR1ko-mouse had to be euthanized 29 dpi after showing clinical signs suggestive for epileptiformic seizures. Only the TNF-tg-mice developed a typical non suppurative meningoencephalitis and

astrocytic changes as found in the preceding studies. In contrast, only in the clinically conspicuous TNFR1ko- and TNFR2ko-mice a non suppurative meningoencephalitis was found, which was associated with astrocytic changes comparable to those in the BoDV-1-infected TNF-tg-animals.

In the wt-, TNF-tg/+-, and TNF-tg/tg-mice, statistically highly significant differences were detected concerning the occurrence and intensity of inflammatory changes as well as the astrocytic activation and GFAP-expression. These features increased in the BoDV-1-infected mice with age/duration of infection and the amount of TNF-overexpression. However in neither of the non infected nor mock-infected mice, inflammatory changes or activation of astrocytes occurred. Furthermore, statistically highly significant correlations were found between mouse strain, age/duration of infection and infection status, which confirms, that all parameters influence each other. The BoDV-1-infected 42 days old TNF-tg/tg-mice had the most severe inflammatory changes associated with the highest number of GFAP-positive astrocytes as well as the most distinct astrocytic hypertrophy partly with enlarged, degenerate-appearing nuclei. This was comparable with the results of the preceding studies. However, increased numbers of GFAP-positive astrocytes, partly with enlarged nuclei, were also found in BoDV-1-infected TNFR1ko- and TNFR2ko-mice 42 dpi, independent from inflammatory changes.

This leads to the conclusion, that the BoDV-1-infection as well as the TNF-system influence the development of inflammatory and astrocytic changes. Using GFAP-immunohistochemistry, no influence of the BoDV-1-infection or the TNF-system concerning the occurrence of morphologic astrocytic changes, as described for the *in vivo* scenario, was found *in vitro*.

Contrary to the primary hypothesis, the results of the *in vivo* examinations on the BoDV-1-infected TNFR1ko- and TNFR2ko-mice were comparable, which might be associated with interactions between the TNFR1 and TNFR2 signaling pathways.

3. To detect possible cell death forms especially in the hypertrophic astrocytes, they were tested for the occurrence of cleaved caspase 3 as proof for apoptosis and intranuclear AIF as proof for the caspase-independent PARP1- and AIF-mediated cell death. Supplementary, non infected and BoDV-1-infected astrocytic cultures pretreated with TNF and/or glutamate were tested exemplarily *in vitro* for the occurrence of LC3 A/B as proof for autophagy. Altogether, none of the investigated cell death forms was increasingly detected in astrocytes *in vivo* or *in vitro*. Therefore, the astrocytic changes in the brains of BoDV-1-infected TNF-tg-, TNFR1ko- and TNFR2ko-mice are not due to any of the cell death forms investigated. Regarding the TNFR1ko- and TNFR2ko-mice examined for the occurrence of apoptosis, statistically significant differences were found concerning the age of the animals/duration of infection. Thus, the older mice or animals with a longer infection period showed more apoptotic cells than the younger mice or animals with a shorter infection period. Especially the deceased

TNFR2ko-mice as well as the euthanized TNFR1ko-mouse exhibited increased numbers of apoptotic cells. These cells consisted mostly of cells with lymphocyte morphology in the vicinity of inflammatory infiltrates, as well as microglia, scattered neurons and very few (morphologically inconspicuous) astrocytes. The amount of apoptotic cells in all astrocytic cultures was less than 2 %, independent of glutamate or TNF-pretreatment or infection status. Intranuclear AIF was detected *in vivo* in all animal groups, predominantly in the caudal brain regions thalamus, rhombencephalon and cerebellum in cells with oligodendrocyte morphology and independent of inflammatory infiltrates. The amount of cells with intranuclear AIF detection in all of the investigated astrocytic cultures was less than 1 %, only in the BoDV-1-infected astrocytes from wt-mice an increase to nearly 2 % was seen after treatment with TNF. The rate of autophagy in all of the investigated astrocytic cultures was less than 2 %, only the non infected astrocytes from TNF-tg/tg-mice treated with glutamate showed a mild increase to nearly 3 %. To what extent this and the occasionally increased rate of AIF-mediated cell death are due to the specific pretreatments and/or the BoDV-1-infection in the case of AIF, should be further analyzed. Also, the occurrence of necroptosis should be investigated in further *in vivo* and *in vitro* studies.

4. The influence of the TNF- and glutamate system on the behavior of astrocytes was tested *in vitro* with the MTT-assay, using glutamate and/or TNF-treated BoDV-1-infected and non infected astrocytes from wt-, TNF-tg/tg-, TNFR1ko- and TNFR2ko-mice. Next to this, the glutamate transporter expression was investigated *in vivo* and exemplarily *in vitro*. The influence of the TNF-receptors was evaluated in more detail by usage of the before mentioned TNFR1ko- and TNFR2ko-mice and exemplary expression analyses of the TNFRs *in vitro* in astrocytic cultures.

Concerning the glutamate transporter expression, no statistically significant influence of the BoDV-1-infection could be detected *in vivo* in any of the mouse cohorts. However, between the different mice strains and in case of GLAST also between the two age groups 21 and 42 days, statistically significant differences were found overall. Thus, there was an age-dependent increase of GLAST-expression and an influence of the TNF-system on the glutamate transporter expression. The GLT1-expression was increased in all mice with an altered TNF-system at both time points, in the case of GLAST however, the expression was lower in the TNFR1ko- and TNFR2ko-mice compared to the TNF-tg/tg- and wt-mice especially at 42 days of age/dpi. Next to this, the inflammatory changes influence the glutamate transporter expression, which was frequently decreased in the immediate vicinity of inflammatory infiltrates. Altogether, even in very high doses, glutamate had no effect on the non infected astrocytes in the MTT-assay, however in the majority of BoDV-1-infected astrocytes it lead to

an activation of astrocytes. Exemplarily glutamate- and/or TNF-treated astrocytes from TNF-tg/tg-mice showed a mild to moderate GLT1-upregulation, as *in vivo*.

By use of the MTT-assay, a dose-dependent decrease of optical density after TNF-treatment was found in the non infected as well as in the BoDV-1-infected astrocytes, except for astrocytes from TNFR1ko-mice. This was not due to cell death, as confirmed by the results of the *in vitro* studies to detect different forms of cell death described above, or to differences in the proliferation rate as assessed by PCNA-expression. Because of this, it must be assumed that changes in cell activation or mitochondrial dehydrogenase activity are the cause for the effects in the MTT-assay, which ought to be confirmed in further studies.

It was also shown, that the TNF- and glutamate system influence each other concerning their effect on astrocytes, because the dose-dependent TNF-effect in the MTT-assay was abrogated by combined treatment with glutamate in all astrocytic cultures. In fact, in the BoDV-1-infected astrocytes a predominant activation was seen. Only in the non infected astrocytes from TNF-tg/tg-mice, a decrease in optical density remained, independent from the TNF-dose. This could be due to a TNF-preconditioning of the astrocytes because of the TNF-overexpression. Compared to the non infected astrocytes, the BoDV-1-infected astrocytes predominantly had higher optical densities, independent from the treatment, which can account for a general activating effect of the infection. This underlines the results from the *in vivo* studies, which also indicate, that the unusual hypertrophic astrocytes in BoDV-1-infected mice rather represent a so far unknown form of astrocytic activation/reactive gliosis. This should be more precisely characterized in further studies.

The investigation of TNF-receptor-expression *in vitro* in astrocytes from TNF-tg/tg mice revealed, that the treatment with glutamate as well as with TNF leads to a doubling of TNFR1-positive astrocytes, whereas TNFR2-expression was only induced by glutamate. Altogether, only half as many astrocytes were TNFR2- than TNFR1-positive, which is indicative that the TNF-effects in the MTT-assay are primarily mediated by TNFR1.

5. Summarizing it is highly likely, that the existing astrocytic dysfunctions/changes in the investigated mouse models play a major role in the pathogenesis of epileptiform seizures and that they do not represent any of the examined forms of cell death, but a previously unknown form of astrocytic activation/reactive astrogliosis. This was associated with different expression profiles, for example of glutamate transporters and TNF-receptors, as shown by *in vitro* investigations on primary cortical astrocytic cultures. This astrocytic activation was dependent on TNF as well as on the BoDV-1-infection, where the BoDV-1-infection facilitates astrocytic activation *in vivo* as well as *in vitro*. In contrast, the unusual morphological appearance of activated astrocytes by higher TNF-levels was only found *in vivo*, however TNF-treatment *in vitro* does not induce astrocytic activation. The typical morphological astrocytic changes as

observed *in vivo*, could not be observed *in vitro*, independent from BoDV-1-infection or mouse strain. These differences can be due to the cellular composition (whole brain *versus* pure astrocytic culture), which shows that the interactions of astrocytes with other brain cells such as microglia and neurons have a major impact on the morphology and function of astrocytes. Furthermore this indicates, that results from cellularly uniform *in vitro* systems cannot always be transferred entirely to *in vivo* systems.

Subsequently, in further studies it will be useful to investigate the metabolism especially of mitochondrial enzymes such as the glutamine synthetase expression as well as the exact form of astrocytic activation (pro-inflammatory or alternative/anti-inflammatory activation) using different systems, for example astrocytic cultures, neuroglial mixed cultures or organotypic slice-cultures. Astrocytes represent an important point of interception between the TNF- and glutamate system and neurons as well as microglia, which is why the modulation of their activation in the context of the pathogenesis of epileptiform seizures might present future therapeutic possibilities against epilepsy.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ADORNATO, B. T., O'BRIEN, J. S., LAMPERT, P. W., ROE, T. F. and NEUSTEIN, H. B. (1972). Cerebral spongy degeneration of infancy. A biochemical and ultrastructural study of affected twins. *Neurology*, 22, 202-210.

AESCHT, E., BÜCHL-ZIMMERMANN, S., BURMESTER, A., DÄNHARDT-PFEIFFER, S., DESEL, C., HAMERS, C., JACH, G., KÄSSENS, M., MAKOVITZKY, J., MULISCH, M., NIXDORF-BERGWEILER, B., PÜTZ, D., RIEDELSHEIMER, B., VAN DEN BOOM, F., WEGERHOFF, R., WELSCH, U. (2010). Färbungen. In: Romeis Mikroskopische Technik. Mulisch, M., Welsch, U. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 182-297.

AFONSO, C. L., AMARASINGHE, G. K., BANYAI, K., BAO, Y., BASLER, C. F., BAVARI, S., BEJERMAN, N., BLASDELL, K. R., BRIAND, F. X., BRIESE, T., BUKREYEV, A., CALISHER, C. H., CHANDRAN, K., CHENG, J., CLAWSON, A. N., COLLINS, P. L., DIETZGEN, R. G., DOLNIK, O., DOMIER, L. L., DÜRRWALD, R., DYE, J. M., EASTON, A. J., EBIHARA, H., FARKAS, S. L., FREITAS-ASTUA, J., FORMENTY, P., FOUCHIER, R. A., FU, Y., GHEDIN, E., GOODIN, M. M., HEWSON, R., HORIE, M., HYNDMAN, T. H., JIANG, D., KITAJIMA, E. W., KOBINGER, G. P., KONDO, H., KURATH, G., LAMB, R. A., LENARDON, S., LEROY, E. M., LI, C. X., LIN, X. D., LIU, L., LONGDON, B., MARTON, S., MAISNER, A., MUHLBERGER, E., NETESOV, S. V., NOWOTNY, N., PATTERSON, J. L., PAYNE, S. L., PAWESKA, J. T., RANDALL, R. E., RIMA, B. K., ROTA, P., RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., SHI, M., SMITHER, S. J., STENGLEIN, M. D., STONE, D. M., TAKADA, A., TERREGINO, C., TESH, R. B., TIAN, J. H., TOMONAGA, K., TORDO, N., TOWNER, J. S., VASILAKIS, N., VERBEEK, M., VOLCHKOV, V. E., WAHL-JENSEN, V., WALSH, J. A., WALKER, P. J., WANG, D., WANG, L. F., WETZEL, T., WHITFIELD, A. E., XIE, J. T., YUEN, K. Y., ZHANG, Y. Z. and KUHN, J. H. (2016). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol*, 161, 2351-2360.

AGARWAL, E., CHAUDHURI, A., LEIPHRAKPAM, P. D., HAFERBIER, K. L., BRATTAIN, M. G. and CHOWDHURY, S. (2014). Akt inhibitor MK-2206 promotes anti-tumor activity and cell death by modulation of AIF and Ezrin in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 14, 145.

AGERHOLM, J. S., HEWICKER-TRAUTWEIN, M., PEPERKAMP, K. and WINDSOR, P. A. (2015). Virus-induced congenital malformations in cattle. *Acta Vet Scand*, 57, 54.

AHLEMEYER, B., KEHR, K., RICHTER, E., HIRZ, M., BAUMGART-VOGT, E. and HERDEN, C. (2013). Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions. *J Neurosci Methods*, 212, 156-164.

AKAOKA, H., SZYMOCHA, R., BEURTON-MARDUEL, P., BERNARD, A., BELIN, M. F. and GIRAUDON, P. (2001). Functional changes in astrocytes by human T-lymphotropic virus type-1 T-lymphocytes. *Virus Res*, 78, 57-66.

AL AWABDH, S., GUPTA-AGARWAL, S., SHEEHAN, D. F., MUIR, J., NORKETT, R., TWELVETREES, A. E., GRIFFIN, L. D. and KITTLER, J. T. (2016). Neuronal activity mediated regulation of glutamate transporter GLT-1 surface diffusion in rat astrocytes in dissociated and slice cultures. *Glia*, 64, 1252-1264.

ALANO, C. C., GARNIER, P., YING, W., HIGASHI, Y., KAUPPINEN, T. M. and SWANSON, R. A. (2010). NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J Neurosci*, 30, 2967-2978.

- ANDERSON, M. A., AO, Y. and SOFRONIEW, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*, 565, 23-29.
- ARAUQUE, A., PARPURA, V., SANZGIRI, R. P. and HAYDON, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22, 208-215.
- BAJRAMOVIC, J. J., MUNTER, S., SYAN, S., NEHRBASS, U., BRAHIC, M. and GONZALEZ-DUNIA, D. (2003). Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *J Virol*, 77, 12222-12231.
- BALOSSO, S., RAVIZZA, T., PEREGO, C., PESCHON, J., CAMPBELL, I. L., DE SIMONI, M. G. and VEZZANI, A. (2005). Tumor necrosis factor- α inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Ann Neurol*, 57, 804-812.
- BALOSSO, S., RAVIZZA, T., PIERUCCI, M., CALCAGNO, E., INVERNIZZI, R., DI GIOVANNI, G., ESPOSITO, E. and VEZZANI, A. (2009). Molecular and functional interactions between tumor necrosis factor- α receptors and the glutamatergic system in the mouse hippocampus: implications for seizure susceptibility. *Neuroscience*, 161, 293-300.
- BANERJEE, S., UPPAL, T., STRAHAN, R., DABRAL, P. and VERMA, S. C. (2016). The modulation of apoptotic pathways by gammaherpesviruses. *Front Microbiol*, 7, 585.
- BARNHART, B. C., ALAPPAT, E. C. and PETER, M. E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol*, 15, 185-193.
- BAUTISTA, J. R., RUBIN, S. A., MORAN, T. H., SCHWARTZ, G. J. and CARBONE, K. M. (1995). Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res*, 90, 45-53.
- BEATTIE, E. C., STELLWAGEN, D., MORISHITA, W., BRESNAHAN, J. C., HA, B. K., VON ZASTROW, M., BEATTIE, M. S. and MALENKA, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF α . *Science*, 295, 2282-2285.
- BECHMANN, I., GALEA, I. and PERRY, V. H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*, 28, 5-11.
- BEGHI, E., CARPIO, A., FORSGREN, L., HESDORFFER, D. C., MALMGREN, K., SANDER, J. W., TOMSON, T. and HAUSER, W. A. (2010). Recommendation for a definition of acute symptomatic seizure. *Epilepsia*, 51, 671-675.
- BENEDICT, C. A., BANKS, T. A. and WARE, C. F. (2003). Death and survival: viral regulation of TNF signaling pathways. *Curr Opin Immunol*, 15, 59-65.
- BENZ, A. P., NIQUET, J., WASTERLAIN, C. G. and RAMI, A. (2014). Status epilepticus in the immature rodent brain alters the dynamics of autophagy. *Curr Neurovasc Res*, 11, 125-135.
- BERENDT, M., FARQUHAR, R. G., MANDIGERS, P. J., PAKOZDY, A., BHATTI, S. F., DE RISIO, L., FISCHER, A., LONG, S., MATIASSEK, K., MUNANA, K., PATTERSON, E. E., PENDERIS, J., PLATT, S., PODELL, M., POTSCSKA, H., PUMAROLA, M. B., RUSBRIDGE, C., STEIN, V. M., TIPOLD, A. and VOLK, H. A. (2015). International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Vet Res*, 11, 182.

- BERG, A. T., BERKOVIC, S. F., BRODIE, M. J., BUCHHALTER, J., CROSS, J. H., VAN EMDE BOAS, W., ENGEL, J., FRENCH, J., GLAUSER, T. A., MATHERN, G. W., MOSHE, S. L., NORDLI, D., PLOUIN, P. and SCHEFFER, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51, 676-685.
- BERG, A. T., DAREFSKY, A. S., HOLFORD, T. R. and SHINNAR, S. (1998). Seizures with fever after unprovoked seizures: an analysis in children followed from the time of a first febrile seizure. *Epilepsia*, 39, 77-80.
- BERNARDINO, L., XAPELLI, S., SILVA, A. P., JAKOBSEN, B., POULSEN, F. R., OLIVEIRA, C. R., VEZZANI, A., MALVA, J. O. and ZIMMER, J. (2005). Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci*, 25, 6734-6744.
- BEZZI, P., DOMERCQ, M., BRAMBILLA, L., GALLI, R., SCHOLS, D., DE CLERCQ, E., VESCOVI, A., BAGETTA, G., KOLLIAS, G., MELDOLESI, J. and VOLTERRA, A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*, 4, 702-710.
- BEZZI, P., GUNDERSEN, V., GALBETE, J. L., SEIFERT, G., STEINHAUSER, C., PILATI, E. and VOLTERRA, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*, 7, 613-620.
- BIGDA, J., BELETSKY, I., BRAKEBUSCH, C., VARFOLOMEEV, Y., ENGELMANN, H., BIGDA, J., HOLTMANN, H. and WALLACH, D. (1994). Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J Exp Med*, 180, 445-460.
- BILLAUD, J. N., LY, C., PHILLIPS, T. R. and DE LA TORRE, J. C. (2000). Borna disease virus persistence causes inhibition of glutamate uptake by feline primary cortical astrocytes. *J Virol*, 74, 10438-10446.
- BINZ, T., LEBELT, J., NIEMANN, H. and HAGENAU, K. (1994). Sequence analyses of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. *Virus Res*, 34, 281-289.
- BOKA, G., ANGLADE, P., WALLACH, D., JAVOY-AGID, F., AGID, Y. and HIRSCH, E. C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 172, 151-154.
- BONFOCO, E., KRAINC, D., ANKARCORONA, M., NICOTERA, P. and LIPTON, S. A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7162-7166.
- BONNAUD, E. M., SZELECHOWSKI, M., BETOURNE, A., FORET, C., THOUARD, A., GONZALEZ-DUNIA, D. and MALNOU, C. E. (2015). Borna disease virus phosphoprotein modulates epigenetic signaling in neurons to control viral replication. *J Virol*, 89, 5996-6008.
- BONTHIUS, D. J. and PERLMAN, S. (2007). Congenital viral infections of the brain: lessons learned from lymphocytic choriomeningitis virus in the neonatal rat. *PLoS Pathog*, 3, e149.
- BONTHIUS, D. J., WRIGHT, R., TSENG, B., BARTON, L., MARCO, E., KARACAY, B. and LARSEN, P. D. (2007). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: spectrum of disease. *Ann Neurol*, 62, 347-355.

- BOURG, M., HERZOG, S., ENCARNACAO, J. A., NOBACH, D., LANGE-HERBST, H., EICKMANN, M. and HERDEN, C. (2013). Bicolored white-toothed shrews as reservoir for borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis*, 19, 2064-2066.
- BOURTEELE, S., OESTERLE, K., PLESCHKA, S., UNTERSTAB, G., EHRHARDT, C., WOLFF, T., LUDWIG, S. and PLANZ, O. (2005). Constitutive activation of the transcription factor NF-kappaB results in impaired borna disease virus replication. *J Virol*, 79, 6043-6051.
- BOYA, P., GONZALEZ-POLO, R. A., CASARES, N., PERFETTINI, J. L., DESSEN, P., LAROCLETTE, N., METIVIER, D., MELEY, D., SOUQUERE, S., YOSHIMORI, T., PIERRON, G., CODOGNO, P. and KROEMER, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 25, 1025-1040.
- BRACHTHÄUSER, L., EISEL, U. L. and HERDEN, C. (2013). Borna disease virus infection of TNF-transgenic neurons: in vitro model for dysregulation of the anticonvulsive dynorphin system. *Clin Neuropathol*, 32, 417-418.
- BRAMANTI, V., TOMASSONI, D., AVITABILE, M., AMENTA, F. and AVOLA, R. (2010). Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2, 558-570.
- BRAMBILLA, L., GUIDOTTI, G., MARTORANA, F., IYER, A. M., ARONICA, E., VALORI, C. F. and ROSSI, D. (2016). Disruption of the astrocytic TNFR1-GDNF axis accelerates motor neuron degeneration and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, 25, 3080-3095.
- BREDESEN, D. E. (2007). Key note lecture: toward a mechanistic taxonomy for cell death programs. *Stroke*, 38, 652-660.
- BRIESE, T., DE LA TORRE, J. C., LEWIS, A., LUDWIG, H. and LIPKIN, W. I. (1992). Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 11486-11489.
- BRIESE, T., SCHNEEMANN, A., LEWIS, A. J., PARK, Y. S., KIM, S., LUDWIG, H. and LIPKIN, W. I. (1994). Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 4362-4366.
- BRÖER, S., KÄUFER, C., HAIST, V., LI, L., GERHAUSER, I., ANJUM, M., BANKSTAHL, M., BAUMGÄRTNER, W. and LÖSCHER, W. (2016). Brain inflammation, neurodegeneration and seizure development following picornavirus infection markedly differ among virus and mouse strains and substrains. *Exp Neurol*, 279, 57-74.
- BUSQUETS, S., ARANDA, X., RIBAS-CARBO, M., AZCON-BIETO, J., LOPEZ-SORIANO, F. J. and ARGILES, J. M. (2003). Tumour necrosis factor-alpha uncouples respiration in isolated rat mitochondria. *Cytokine*, 22, 1-4.
- CARBONE, K. M., MOENCH, T. R. and LIPKIN, W. I. (1991). Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol*, 50, 205-214.
- CARBONE, K. M., TRAPP, B. D., GRIFFIN, J. W., DUCHALA, C. S. and NARAYAN, O. (1989). Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 48, 631-644.

- CARMEN, J., ROTHSTEIN, J. D. and KERR, D. A. (2009). Tumor necrosis factor- α modulates glutamate transport in the CNS and is a critical determinant of outcome from viral encephalomyelitis. *Brain Res*, 1263, 143-154.
- CHANG, C. Y., LI, J. R., CHEN, W. Y., OU, Y. C., LAI, C. Y., HU, Y. H., WU, C. C., CHANG, C. J. and CHEN, C. J. (2015). Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-infected astrocytes. *Glia*, 63, 1915-1932.
- CHASE, G., MAYER, D., HILDEBRAND, A., FRANK, R., HAYASHI, Y., TOMONAGA, K. and SCHWEMMLE, M. (2007). Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol*, 81, 743-749.
- CHEN, S. D., CHANG, A. Y. and CHUANG, Y. C. (2010). The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. *J Bioenerg Biomembr*, 42, 461-465.
- CHENG, J., NATH, A., KNUDSEN, B., HOCHMAN, S., GEIGER, J. D., MA, M. and MAGNUSON, D. S. (1998). Neuronal excitatory properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Neuroscience*, 82, 97-106.
- CHEUNG, E. C., MELANSON-DRAPEAU, L., CREGAN, S. P., VANDERLUIT, J. L., FERGUSON, K. L., MCINTOSH, W. C., PARK, D. S., BENNETT, S. A. and SLACK, R. S. (2005). Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J Neurosci*, 25, 1324-1334.
- CHO, Y. S., CHALLA, S., MOQUIN, D., GENGA, R., RAY, T. D., GUILDFORD, M. and CHAN, F. K. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137, 1112-1123.
- CHOI, D. W., MAULUCCI-GEDDE, M. and KRIEGSTEIN, A. R. (1987). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 7, 357-368.
- CHOI, H. B., GORDON, G. R., ZHOU, N., TAI, C., RUNGTA, R. L., MARTINEZ, J., MILNER, T. A., RYU, J. K., MCLARNON, J. G., TRESGUERRES, M., LEVIN, L. R., BUCK, J. and MACVICAR, B. A. (2012). Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron*, 75, 1094-1104.
- CHOI, J., NORDLI, D. R., JR., ALDEN, T. D., DIPATRI, A., JR., LAUX, L., KELLEY, K., ROSENOW, J., SCHUELE, S. U., RAJARAM, V. and KOH, S. (2009). Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *J Neuroinflammation*, 6, 38.
- CHOI, S. J., LEE, K. H., PARK, H. S., KIM, S. K., KOH, C. M. and PARK, J. Y. (2005). Differential expression, shedding, cytokine regulation and function of TNFR1 and TNFR2 in human fetal astrocytes. *Yonsei Med J*, 46, 818-826.
- CHRISTOPHERSON, K. S., ULLIAN, E. M., STOKES, C. C., MULLOWNEY, C. E., HELL, J. W., AGAH, A., LAWLER, J., MOSHER, D. F., BORNSTEIN, P. and BARRES, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120, 421-433.
- COMPANS, R. W., MELSEN, L. R. and DE LA TORRE, J. C. (1994). Virus-like particles in MDCK cells persistently infected with Borna disease virus. *Virus Res*, 33, 261-268.

- CREGAN, S. P., FORTIN, A., MACLAURIN, J. G., CALLAGHAN, S. M., CECCONI, F., YU, S. W., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., PARK, D. S., KROEMER, G. and SLACK, R. S. (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol*, 158, 507-517.
- CRESPEL, A., COUBES, P., ROUSSET, M. C., BRANA, C., ROUGIER, A., RONDOUIN, G., BOCKAERT, J., BALDY-MOULINIER, M. and LERNER-NATOLI, M. (2002). Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain Res*, 952, 159-169.
- CUBITT, B., OLDSTONE, C. and DE LA TORRE, J. C. (1994). Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol*, 68, 1382-1396.
- CULMSEE, C., ZHU, C., LANDSHAMER, S., BECATTINI, B., WAGNER, E., PELLECCIA, M., BLOMGREN, K. and PLESNILA, N. (2005). Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, 25, 10262-10272.
- CZYGAN, M., HALLENSLEBEN, W., HOFER, M., POLLAK, S., SAUDER, C., BILZER, T., BLUMCKE, I., RIEDERER, P., BOGERTS, B., FALKAI, P., SCHWARZ, M. J., MASLIAH, E., STAEHEL, P., HUFERT, F. T. and LIEB, K. (1999). Borna disease virus in human brains with a rare form of hippocampal degeneration but not in brains of patients with common neuropsychiatric disorders. *J Infect Dis*, 180, 1695-1699.
- DAS, T., HOARAU, J. J., JAFFAR BANDJEE, M. C., MAQUART, M. and GASQUE, P. (2015). Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. *J Gen Virol*, 96, 294-310.
- DASH, S., CHAVA, S., AYDIN, Y., CHANDRA, P. K., FERRARIS, P., CHEN, W., BALART, L. A., WU, T. and GARRY, R. F. (2016). Hepatitis C virus infection induces autophagy as a prosurvival mechanism to alleviate hepatic ER-stress response. *Viruses*, 8, 150.
- DE LA TORRE, J. C. (2002). Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Front Biosci*, 7, d569-579.
- DE SIMONI, M. G., PEREGO, C., RAVIZZA, T., MONETA, D., CONTI, M., MARCHESI, F., DE LUIGI, A., GARATTINI, S. and VEZZANI, A. (2000). Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 12, 2623-2633.
- DECLERCQ, W., DENECKER, G., FIERS, W. and VANDENABEELE, P. (1998). Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol*, 161, 390-399.
- DEGTEREV, A. and YUAN, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 378-390.
- DESCHL, U., STITZ, L., HERZOG, S., FRESE, K. and ROTT, R. (1990). Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol*, 81, 41-50.

DETJE, C. N., LIENENKLAUS, S., CHHATBAR, C., SPANIER, J., PRAJEETH, C. K., SOLDNER, C., TOVEY, M. G., SCHLUTER, D., WEISS, S., STANGEL, M. and KALINKE, U. (2015). Upon intranasal vesicular stomatitis virus infection, astrocytes in the olfactory bulb are important interferon Beta producers that protect from lethal encephalitis. *J Virol*, 89, 2731-2738.

DIAMOND, J. S. and JAHR, C. E. (2000). Synaptically released glutamate does not overwhelm transporters on hippocampal astrocytes during high-frequency stimulation. *J Neurophysiol*, 83, 2835-2843.

DINIZ, J. A., DA ROSA, A. P., GUZMAN, H., XU, F., XIAO, S. Y., POPOV, V. L., VASCONCELOS, P. F. and TESH, R. B. (2006). West Nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: the role of astrocytes in chronic infection. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 691-696.

DONG, Y. and BENVENISTE, E. N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia*, 36, 180-190.

DOPP, J. M., MACKENZIE-GRAHAM, A., OTERO, G. C. and MERRILL, J. E. (1997). Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol*, 75, 104-112.

DRINGEN, R., PFEIFFER, B. and HAMPRECHT, B. (1999). Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci*, 19, 562-569.

DUMONT, A. O., GOURSAUD, S., DESMET, N. and HERMANS, E. (2014). Differential regulation of glutamate transporter subtypes by pro-inflammatory cytokine TNF-alpha in cortical astrocytes from a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 9, e97649.

DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., HERZOG, S. and NOWOTNY, N. (2007). Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Rev Med Virol*, 17, 181-203.

DÜRRWALD, R., KOLODZIEJEK, J., WEISSENBOCK, H. and NOWOTNY, N. (2014). The bicolored white-toothed shrew *Crocodyra leucodon* (HERMANN 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS One*, 9, e93659.

EDDLESTON, M. and MUCKE, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes—Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54, 15-36.

EID, T., THOMAS, M. J., SPENCER, D. D., RUNDEN-PRAN, E., LAI, J. C., MALTHANKAR, G. V., KIM, J. H., DANBOLT, N. C., OTTERSEN, O. P. and DE LANEROLLE, N. C. (2004). Loss of glutamate synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*, 363, 28-37.

EISENMAN, L. M., BROTHERS, R., TRAN, M. H., KEAN, R. B., DICKSON, G. M., DIETZSCHOLD, B. and HOOPER, D. C. (1999). Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *J Neurovirol*, 5, 181-189.

ELBERS, J. M., BITNUN, A., RICHARDSON, S. E., FORD-JONES, E. L., TELLIER, R., WALD, R. M., PETRIC, M., KOLSKI, H., HEURTER, H. and MACGREGOR, D. (2007). A 12-year prospective study of childhood herpes simplex encephalitis: is there a broader spectrum of disease? *Pediatrics*, 119, e399-407.

- ELLISON, D., LOVE, S., CHIMELLI, L., HARDING, B. N., LOWE, J. S., VINTERS, H. V., BRANDNER, S. and YONG, W. H. (2013). Pathologic reactions in the CNS. In: *Neuropathology: A reference text of CNS pathology*. Ellison, D., Love, S., Chimelli, L., Harding, B. N., Lowe, J. S., Vinters, H. V., Brandner, S. and Yong, W. H. (Hrsg.), Mosby Elsevier, Edinburgh, UK: 3-30.
- ERICKSON, S. L., DE SAUVAGE, F. J., KIKLY, K., CARVER-MOORE, K., PITTS-MEEK, S., GILLET, N., SHEEHAN, K. C., SCHREIBER, R. D., GOEDEL, D. V. and MOORE, M. W. (1994). Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature*, 372, 560-563.
- FARINA, C., ALOISI, F. and MEINL, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*, 28, 138-145.
- FIGIEL, I. and DZWONEK, K. (2007). TNF α and TNF receptor 1 expression in the mixed neuronal-glial cultures of hippocampal dentate gyrus exposed to glutamate or trimethyltin. *Brain Res*, 1131, 17-28.
- FINE, S. M., ANGEL, R. A., PERRY, S. W., EPSTEIN, L. G., ROTHSTEIN, J. D., DEWHURST, S. and GELBARD, H. A. (1996). Tumor necrosis factor α inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol Chem*, 271, 15303-15306.
- FISHER, R. S., ACEVEDO, C., ARZIMANOGLU, A., BOGACZ, A., CROSS, J. H., ELGER, C. E., ENGEL, J., JR., FORSGREN, L., FRENCH, J. A., GLYNN, M., HESDORFFER, D. C., LEE, B. I., MATHERN, G. W., MOSHE, S. L., PERUCCA, E., SCHEFFER, I. E., TOMSON, T., WATANABE, M. and WIEBE, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55, 475-482.
- FLEMING, A., NODA, T., YOSHIMORI, T. and RUBINSZTEIN, D. C. (2011). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol*, 7, 9-17.
- FOCANT, M. C., GOURSAUD, S., NIZET, Y. and HERMANS, E. (2011). Differential regulation of C-terminal splice variants of the glutamate transporter GLT-1 by tumor necrosis factor- α in primary cultures of astrocytes. *Neurochem Int*, 58, 751-758.
- FONTAINE, V., MOHAND-SAID, S., HANOTEAU, N., FUCHS, C., PFIZENMAIER, K. and EISEL, U. (2002). Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci*, 22, RC216.
- FORMISANO, S., HORNIG, M., YADDANAPUDI, K., VASISHTHA, M., PARSONS, L. H., BRIESE, T., LIPKIN, W. I. and WILLIAMS, B. L. (2017). Central nervous system infection with Borna disease virus causes kynurenine pathway dysregulation and neurotoxic quinolinic acid production. *J Virol*, 91, e00673-17.
- FORS, S., VAN MEERVENNE, S., JESEREVICS, J., RAKAUSKAS, M. and CIZINAUSKAS, S. (2015). Feline hippocampal and piriform lobe necrosis as a consequence of severe cluster seizures in two cats in Finland. *Acta Vet Scand*, 57, 41.
- FOTHERINGHAM, J., DONATI, D., AKHYANI, N., FOGDELL-HAHN, A., VORTMEYER, A., HEISS, J. D., WILLIAMS, E., WEINSTEIN, S., BRUCE, D. A., GAILLARD, W. D., SATO, S., THEODORE, W. H. and JACOBSON, S. (2007). Association of human herpesvirus-6B with mesial temporal lobe epilepsy. *PLoS Med*, 4, e180.

FOTIN-MLECZEK, M., HENKLER, F., SAMEL, D., REICHWEIN, M., HAUSSEER, A., PARMRYD, I., SCHEURICH, P., SCHMID, J. A. and WAJANT, H. (2002). Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci*, 115, 2757-2770.

FREUDE, S., HAUSMANN, J., HOFER, M., PHAM-MITCHELL, N., CAMPBELL, I. L., STAEHEL, P. and PAGENSTECHEER, A. (2002). Borna disease virus accelerates inflammation and disease associated with transgenic expression of interleukin-12 in the central nervous system. *J Virol*, 76, 12223-12232.

FU, D. X., KUO, Y. L., LIU, B. Y., JEANG, K. T., GIAN CZ. (2003). Human T-lymphotropic virus type I tax activates I-kappa B kinase by inhibiting I-kappa B kinase-associated serine/threonine protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 278:1487-1493.

FUJIKAWA, D. G., SHINMEI, S. S., ZHAO, S. and AVILES, E. R., JR. (2007). Caspase-dependent programmed cell death pathways are not activated in generalized seizure-induced neuronal death. *Brain Res*, 1135, 206-218.

FUJINO, K., HORIE, M., HONDA, T., MERRIMAN, D. K. and TOMONAGA, K. (2014). Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 13175-13180.

GABEL, S., KONCINA, E., DORBAN, G., HEURTAUX, T., BIRCK, C., GLAAB, E., MICHELUCCI, A., HEUSCHLING, P. and GRANDBARBE, L. (2016). Inflammation promotes a conversion of astrocytes into neural progenitor cells via NF-kappaB activation. *Mol Neurobiol*, 53, 5041-5055.

GALLUZZI, L., VITALE, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., EL-DEIRY, W. S., FULDA, S., GOTTLIEB, E., GREEN, D. R., HENGARTNER, M. O., KEPP, O., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., LU, X., MADEO, F., MALORNI, W., MEHLEN, P., NUNEZ, G., PETER, M. E., PIACENTINI, M., RUBINSZTEIN, D. C., SHI, Y., SIMON, H. U., VANDENABEELE, P., WHITE, E., YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G. and KROEMER, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*, 19, 107-120.

GARCIA-CACERES, C., LECHUGA-SANCHO, A., ARGENTE, J., FRAGO, L. M. and CHOWEN, J. A. (2008). Death of hypothalamic astrocytes in poorly controlled diabetic rats is associated with nuclear translocation of apoptosis inducing factor. *J Neuroendocrinol*, 20, 1348-1360.

GARDNER, M. B. (1985). Retroviral spongiform polioencephalomyelopathy. *Rev Infect Dis*, 7, 99-110.

GAVIER-WIDEN, D., WELLS, G. A., SIMMONS, M. M., WILESMITH, J. W. and RYAN, J. (2001). Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *J Comp Pathol*, 124, 52-59.

GELEZIUNAS, R., XU, W., TAKEDA, K., ICHIJO, H., GREENE, W.C. (2001). HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*, 410, 834-838.

GERHAUSER, I., WOHLSEIN, P., ERNST, H., GERMANN, P. G. and BAUMGÄRTNER, W. (2013). Vacuolation and mineralisation as dominant age-related findings in hamster brains. *Exp Toxicol Pathol*, 65, 375-381.

- GERLIER, D. and THOMASSET, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*, 94, 57-63.
- GETTS, D. R., BALCAR, V. J., MATSUMOTO, I., MULLER, M. and KING, N. J. (2008). Viruses and the immune system: their roles in seizure cascade development. *J Neurochem*, 104, 1167-1176.
- GILABERT-JUAN, J., BUENO-FERNANDEZ, C., CASTILLO-GOMEZ, E. and NACHER, J. (2017). Reduced interneuronal dendritic arborization in CA1 but not in CA3 region of mice subjected to chronic mild stress. *Brain Behav*, 7, e00534.
- GIMSA, U., MITCHISON, N. A. and BRUNNER-WEINZIERL, M. C. (2013). Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm*, 2013, 320519.
- GOLDMAN, S. (2003). Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci*, 26, 590-596.
- GONZALEZ-DUNIA, D., CUBITT, B. and DE LA TORRE, J. C. (1998). Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol*, 72, 783-788.
- GONZALEZ-DUNIA, D., EDDLESTON, M., MACKMAN, N., CARBONE, K. and DE LA TORRE, J. C. (1996). Expression of tissue factor is increased in astrocytes within the central nervous system during persistent infection with borna disease virus. *J Virol*, 70, 5812-5820.
- GONZALEZ-DUNIA, D., VOLMER, R., MAYER, D. and SCHWEMMLE, M. (2005). Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res*, 111, 224-234.
- GONZALEZ-DUNIA, D., WATANABE, M., SYAN, S., MALLORY, M., MASLIAH, E. and DE LA TORRE, J. C. (2000). Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J Virol*, 74, 3441-3448.
- GOSZTONYI, G. and LUDWIG, H. (1995). Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 190, 39-73.
- GRABNER, A. and FISCHER, A. (1991). Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years. *Tierärztl Prax*, 19, 68-73.
- GRABNER, A., HERZOG, S., LANGE-HERBST, H. and FRESE, K. (2002). Die intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden. *Pferdeheilkunde* 18, 579-586.
- GRELL, M., DOUNI, E., WAJANT, H., LOHDEN, M., CLAUSS, M., MAXEINER, B., GEORGOPOULOS, S., LESSLAUER, W., KOLLIAS, G., PFIZENMAIER, K. and SCHEURICH, P. (1995). The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83, 793-802.
- GRELL, M., SCHEURICH, P., MEAGER, A. and PFIZENMAIER, K. (1993). TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TNF)-receptors can independently mediate cytotoxicity. *Lymphokine Cytokine Res*, 12, 143-148.
- GRELL, M., WAJANT, H., ZIMMERMANN, G. and SCHEURICH, P. (1998). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 570-575.

GU, B., ZHANG, G. F., LI, L. Y., ZHOU, F., FENG, D. J., DING, C. L., CHI, J., ZHANG, C., GUO, D. D., WANG, J. F., ZHOU, H., YAO, K. and HU, W. X. (2011). Human herpesvirus 6A induces apoptosis of primary human fetal astrocytes via both caspase-dependent and -independent pathways. *Virology*, 8, 530.

HABBAS, S., SANTELLO, M., BECKER, D., STUBBE, H., ZAPPALÀ, G., LIAUDET, N., KLAUS, F. R., KOLLIAS, G., FONTANA, A., PRYCE, C. R., SUTER, T. and VOLTERRA, A. (2015). Neuroinflammatory TNF α impairs memory via astrocyte signaling. *Cell*, 163, 1730-1741.

HALLENSLEBEN, W., SCHWEMMLE, M., HAUSMANN, J., STITZ, L., VOLK, B., PAGENSTECHER, A. and STAEHEL, P. (1998). Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol*, 72, 4379-4386.

HAMBY, M. E., COPPOLA, G., AO, Y., GESCHWIND, D. H., KHAKH, B. S. and SOFRONIEW, M. V. (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *J Neurosci*, 32, 14489-14510.

HANS, A., SYAN, S., CROSIO, C., SASSONE-CORSI, P., BRAHIC, M. and GONZALEZ-DUNIA, D. (2001). Borna disease virus persistent infection activates mitogen-activated protein kinase and blocks neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem*, 276, 7258-7265.

HASEGAWA, D., FUJITA, M., NAKAMURA, S., TAKAHASHI, K. and ORIMA, H. (2002). Electroencephalographic and histological findings in a Shetland sheepdog with intractable epilepsy. *J Vet Med Sci*, 64, 277-279.

HATALSKI, C. G., HICKEY, W. F. and LIPKIN, W. I. (1998). Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol*, 90, 137-142.

HAUSMANN, J., HALLENSLEBEN, W., DE LA TORRE, J. C., PAGENSTECHER, A., ZIMMERMANN, C., PIRCHER, H. and STAEHEL, P. (1999). T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 9769-9774.

HAUSMANN, J., PAGENSTECHER, A., BAUR, K., RICHTER, K., RZIHA, H. J. and STAEHEL, P. (2005). CD8 T cells require gamma interferon to clear borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *J Virol*, 79, 13509-13518.

HAUSMANN, J., SCHAMEL, K. and STAEHEL, P. (2001). CD8(+) T lymphocytes mediate Borna disease virus-induced immunopathology independently of perforin. *J Virol*, 75, 10460-10466.

HERDEN, C. (2009). Untersuchungen zu Pathogenese, Neurotropismus und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie, Habilitationsschrift.

HERDEN, C., BRIESE, T., LIPKIN, W. and RICHT, J. (2013). Bornaviridae. In: *Fields Virology*. Knipe, D. M., Howley, P. M. (Hrsg.), Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA: 1124-1150.

- HERDEN, C., HERZOG, S., RICHT, J. A., NESSELER, A., CHRIST, M., FAILING, K. and FRESE, K. (2000). Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol*, 10, 39-48.
- HERDEN, C., HERZOG, S., WEHNER, T., ZINK, C., RICHT, J. and FRESE, K. (1999). Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. *Equine Infect Dis*, 8, 286-290.
- HERDEN, C., SCHLUESENER, H. J. and RICHT, J. A. (2005). Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 31, 512-521.
- HERDER, V., WOHLSEIN, P., PETERS, M., HANSMANN, F. and BAUMGÄRTNER, W. (2012). Salient lesions in domestic ruminants infected with the emerging so-called Schmallenberg virus in Germany. *Vet Pathol*, 49, 588-591.
- HERNDON, R. M. (1964). The fine structure of the rat cerebellum. II. The stellate neurons, granule cells, and glia. *J Cell Biol*, 23, 277-293.
- HERRMANN, J. E., IMURA, T., SONG, B., QI, J., AO, Y., NGUYEN, T. K., KORSACK, R. A., TAKEDA, K., AKIRA, S. and SOFRONIEW, M. V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci*, 28, 7231-7243.
- HERZOG, S., FRESE, K. and ROTT, R. (1991). Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J Gen Virol*, 72, 535-540.
- HERZOG, S. and ROTT, R. (1980). Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med. Microbiol Immunol*, 168, 153-158.
- HESKE, L., NODTVEDT, A., JADERLUND, K. H., BERENDT, M. and EGENVALL, A. (2014). A cohort study of epilepsy among 665,000 insured dogs: incidence, mortality and survival after diagnosis. *Vet J*, 202, 471-476.
- HILBE, M., HERRSCHE, R., KOLODZIEJEK, J., NOWOTNY, N., ZLINSZKY, K. and EHRENSPERGER, F. (2006). Shrews as reservoir hosts of Borna disease virus. *Emerging Infect Dis*, 12, 675-677.
- HIRANO, N., KAO, M. and LUDWIG, H. (1983). Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol*, 64, 1521-1530.
- HOFER, M., HAUSMANN, J., STAEHELI, P. and PAGENSTECHER, A. (2004). Cerebral expression of interleukin-12 induces neurological disease via differential pathways and recruits antigen-specific T cells in virus-infected mice. *Am J Pathol*, 165, 949-958.
- HOFER, M. J., SCHINDLER, A. R., EHRENSPERGER, F., STAEHELI, P. and PAGENSTECHER, A. (2006). Absence of Borna disease virus in the CNS of epilepsy patients. *J Clin Virol*, 36, 84-85.
- HOFFMANN, B., TAPPE, D., HOPER, D., HERDEN, C., BOLDT, A., MAWRIN, C., NIEDERSTRASSER, O., MÜLLER, T., JENCKEL, M., VAN DER GRINTEN, E., LUTTER, C., ABENDROTH, B., TEIFKE, J. P., CADAR, D., SCHMIDT-CHANASIT, J., ULRICH, R. G. and BEER, M. (2015). A variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *N Engl J Med*, 373, 154-162.

HONDA, T. and TOMONAGA, K. (2013). Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses*, 5, 1978-1990.

HONDA, T. and TOMONAGA, K. (2016). Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity. *Mob Genet Elements*, 6, e1165785.

HONKAVUORI, K. S., SHIVAPRASAD, H. L., WILLIAMS, B. L., QUAN, P. L., HORNIG, M., STREET, C., PALACIOS, G., HUTCHISON, S. K., FRANCA, M., EGHOLM, M., BRIESE, T. and LIPKIN, W. I. (2008). Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis*, 14, 1883-1886.

HORIE, M., KOBAYASHI, Y., SUZUKI, Y. and TOMONAGA, K. (2013). Comprehensive analysis of endogenous bornavirus-like elements in eukaryote genomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368, 20120499.

HORNIG, M., BRIESE, T., LICINIO, J., KHABBAZ, R. F., ALTSHULER, L. L., POTKIN, S. G., SCHWEMMLE, M., SIEMETZKI, U., MINTZ, J., HONKAVUORI, K., KRAEMER, H. C., EGAN, M. F., WHYBROW, P. C., BUNNEY, W. E. and LIPKIN, W. I. (2012). Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry*, 17, 486-493.

HORNIG, M., WEISSENBOCK, H., HORSROFT, N. and LIPKIN, W. I. (1999). An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 12102-12107.

HOTCHIN, J., KINCH, W. and BENSON, L. (1971). Lytic and turbid plaque-type mutants of lymphocytic choriomeningitis virus as a cause of neurological disease or persistent infection. *Infect Immun*, 4, 281-286.

HU, L., HAN, B., ZHAO, X., MI, L., SONG, Q., WANG, J., SONG, T. and HUANG, C. (2016). Chronic early postnatal scream sound stress induces learning deficits and NMDA receptor changes in the hippocampus of adult mice. *Neuroreport*, 27, 397-403.

HUANG, R., GAO, H., ZHANG, L., JIA, J., LIU, X., ZHENG, P., MA, L., LI, W., DENG, J., WANG, X., YANG, L., WANG, M. and XIE, P. (2012). Borna disease virus infection perturbs energy metabolites and amino acids in cultured human oligodendroglia cells. *PLoS One*, 7, e44665.

HUANG, T. L. and O'BANION, M. K. (1998). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha suppress dexamethasone induction of glutamine synthetase in primary mouse astrocytes. *J Neurochem*, 71, 1436-1442.

HUANG, Y. H. and BERGLES, D. E. (2004). Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 346-352.

HUBBARD, J. A., SZU, J. I., YONAN, J. M. and BINDER, D. K. (2016). Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. *Exp Neurol*, 283, 85-96.

HUNTER, K. E. and HATTEN, M. E. (1995). Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 2061-2065.

IRIGOIN, C., RODRIGUEZ, E. M., HEINRICHS, M., FRESE, K., HERZOG, S., OKSCHE, A. and ROTT, R. (1990). Immunocytochemical study of the subcommissural organ of rats with induced postnatal hydrocephalus. *Exp Brain Res*, 82, 384-392.

- JACKSON, J. H. (1873). On the anatomical, physiological, and pathological investigation of epilepsies. *West Ridings Lunatic Asylum Med Reports*, 3, 315-360.
- JAHNS, H., CALLANAN, J. J., MCELROY, M. C., SAMMIN, D. J. and BASSETT, H. F. (2006). Age-related and non-age-related changes in 100 surveyed horse brains. *Vet Pathol*, 43, 740-750.
- JANG, E., KIM, J. H., LEE, S., KIM, J. H., SEO, J. W., JIN, M., LEE, M. G., JANG, I. S., LEE, W. H. and SUK, K. (2013). Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. *J Immunol*, 191, 5204-5219.
- JHA, M. K., LEE, W. H. and SUK, K. (2016). Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders. *Biochem Pharmacol*, 103, 1-16.
- JOUAVILLE, L. S., PINTON, P., BASTIANUTTO, C., RUTTER, G. A. and RIZZUTO, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 13807-13812.
- JOVIC, N. J. (2013). Epilepsy in children with subacute sclerosing panencephalitis. *Srp Arh Celok Lek*, 141, 434-440.
- JUREWICZ, A., MATYSIAK, M., TYBOR, K., KILIANEK, L., RAINE, C. S. and SELMAJ, K. (1999). Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain*, 128, 2675-2688.
- KAISER, W. J., UPTON, J. W. and MOCARSKI, E. S. (2013). Viral modulation of programmed necrosis. *Curr Opin Virol*, 3, 296-306.
- KAKOTI, G., DUTTA, P., RAM DAS, B., BORAH, J. and MAHANTA, J. (2013). Clinical profile and outcome of Japanese encephalitis in children admitted with acute encephalitis syndrome. *Biomed Res Int*, 2013, 152656.
- KANG, T. C., KIM, D. S., KWAK, S. E., KIM, J. E., WON, M. H., KIM, D. W., CHOI, S. Y. and KWON, O. S. (2006). Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia*, 54, 258-271.
- KARTAL, A., CITAK KURT, A. N., HIRFANOGLU, T., AYDIN, K. and SERDAROGLU, A. (2015). Subacute sclerosing panencephalitis in a child with recurrent febrile seizures. *Case Rep Pediatr*, 2015, 783936.
- KATZ, J. B., ALSTAD, D., JENNY, A. L., CARBONE, K. M., RUBIN, S. A. and WALTRIP, R. W., 2ND. (1998). Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest*, 10, 338-343.
- KEARSLEY-FLEET, L., O'NEILL, D. G., VOLK, H. A., CHURCH, D. B. and BRODBELT, D. C. (2013). Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK. *Vet Rec*, 172, 338.
- KEHR, K. (2016). Ausbreitungs- und Persistenzstrategien des Virus der Bornaschen Krankheit, Justus-Liebig-Universität Giessen, Institut für Veterinär-Pathologie, Inaugural Dissertation.

- KELLINGHAUS, C., ENGBRING, C., KOVAC, S., MODEL, G., BOESEBECK, F., FISCHER, M., ANNEKEN, K., KLONNE, K., REICHEL, D., EVERS, S. and HUSSTEDT, I. W. (2008). Frequency of seizures and epilepsy in neurological HIV-infected patients. *Seizure*, 17, 27-33.
- KIJA, E., NDOONDO, A., SPITTAL, G., HARDIE, D. R., ELEY, B. and WILMSHURST, J. M. (2015). Subacute sclerosing panencephalitis in South African children following the measles outbreak between 2009 and 2011. *S Afr Med J*, 105, 713-718.
- KING, N. J., GETTS, D. R., GETTS, M. T., RANA, S., SHRESTHA, B. and KESSON, A. M. (2007). Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol Cell Biol*, 85, 33-42.
- KIRKMAN, N. J., LIBBEY, J. E., WILCOX, K. S., WHITE, H. S. and FUJINAMI, R. S. (2010). Innate but not adaptive immune responses contribute to behavioral seizures following viral infection. *Epilepsia*, 51, 454-464.
- KISTLER, A. L., GANCZ, A., CLUBB, S., SKEWES-COX, P., FISCHER, K., SORBER, K., CHIU, C. Y., LUBLIN, A., MECHANI, S., FARNOUSHI, Y., GRENINGER, A., WEN, C. C., KARLENE, S. B., GANEM, D. and DERISI, J. L. (2008). Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of periventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology*, 5, 88.
- KOGO, J., TAKEBA, Y., KUMAI, T., KITAOKA, Y., MATSUMOTO, N., UENO, S. and KOBAYASHI, S. (2006). Involvement of TNF- α in glutamate-induced apoptosis in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res*, 1122, 201-208.
- KORN, T., MAGNUS, T. and JUNG, S. (2005). Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor- α . *FASEB J*, 19, 1878-1880.
- KÖSTER-PATZLAFF, C., HOSSEINI, S. M. and REUSS, B. (2007). Persistent Borna Disease Virus infection changes expression and function of astroglial gap junctions in vivo and in vitro. *Brain Res*, 1184, 316-332.
- KÖSTER-PATZLAFF, C., HOSSEINI, S. M. and REUSS, B. (2009). Loss of connexin36 in rat hippocampus and cerebellar cortex in persistent Borna disease virus infection. *J Chem Neuroanat*, 37, 118-127.
- KRAMER, K. (2006). Experimentelle Infektion von TNF α -transgenen Mäusen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit - Charakterisierung der Entzündungsreaktion und der Virusreplikation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie, PhD-These.
- KRAMER, K., SCHAUDIEN, D., EISEL, U. L., HERZOG, S., RICHT, J. A., BAUMGÄRTNER, W. and HERDEN, C. (2012). TNF-overexpression in Borna disease virus-infected mouse brains triggers inflammatory reaction and epileptic seizures. *PLoS One*, 7, e41476.
- KRAUS, I., EICKMANN, M., KIERMAYER, S., SCHEFFCZIK, H., FLUESS, M., RICHT, J. A. and GARTEN, W. (2001). Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol*, 75, 12098-12104.
- KRAWCZYK, A., JAWORSKA-ADAMU, J. and RYCERZ, K. (2015). Immunohistochemical evaluation of hippocampal CA1 region astrocytes in 10-day-old rats after monosodium glutamate treatment. *Pol J Vet Sci*, 18, 767-774.

KUHN, J. H., DÜRRWALD, R., BAO, Y., BRIESE, T., CARBONE, K., CLAWSON, A. N., DERISI, J. L., GARTEN, W., JAHRLING, P. B., KOŁODZIEJEK, J., RUBBENSTROTH, D., SCHWEMMLE, M., STENGLEIN, M., TOMONAGA, K., WEISSENBOCK, H. and NOWOTNY, N. (2014). Taxonomic reorganization of the family Bornaviridae. *Arch Virol*, 160, 621-632.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., and ASTER, J. C. (2014). Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death. In: *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Kumar, V., Abbas, A. K., and Aster, J. C. (Hrsg.), Saunders Elsevier, Philadelphia, USA: 31-68.

KUMAR, G., MITTAL, S., MOUDGIL, S. S., KUPSKY, W. J. and SHAH, A. K. (2013). Histopathological evidence that hippocampal atrophy following status epilepticus is a result of neuronal necrosis. *J Neurol Sci*, 334, 186-191.

KUPKE, A. (2016). Die Rolle des olfaktorischen Epithels in der initialen Phase der Infektion mit dem neurotrophen Borna disease virus. Justus-Liebig-Universität Giessen, Institut für Veterinär-Pathologie, Inaugural Dissertation.

KUPKE, A., WENISCH, S., FAILING, K. and HERDEN, C. (2016). Intranasal Location and Immunohistochemical Characterization of the Equine Olfactory Epithelium. *Front Neuroanat*, 10, 97.

LANDSHAMER, S., HOEHN, M., BARTH, N., DUVEZIN-CAUBET, S., SCHWAKE, G., TOBABEN, S., KAZHDAN, I., BECATTINI, B., ZAHLER, S., VOLLMAR, A., PELLECCIA, M., REICHERT, A., PLESNILA, N., WAGNER, E. and CULMSEE, C. (2008). Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ*, 15, 1553-1563.

LEE, S., PARK, J. Y., LEE, W. H., KIM, H., PARK, H. C., MORI, K. and SUK, K. (2009). Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *J Neurosci*, 29, 234-249.

LEHRMANN, E., GUIDETTI, P., LOVE, A., WILLIAMSON, J., BERTRAM, E. H. and SCHWARCZ, R. (2008). Glial activation precedes seizures and hippocampal neurodegeneration in measles virus-infected mice. *Epilepsia*, 49 Suppl 2, 13-23.

LEIBOVITCH, E. C. and JACOBSON, S. (2015). Human Herpesvirus 6 as a Viral Trigger in Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *J Infect Dis*, 212, 1011-1013.

LENNARTZ, F., BAYER, K., CZERWONKA, N., LU, Y., KEHR, K., HIRZ, M., STEINMETZER, T., GARTEN, W. and HERDEN, C. (2016). Surface glycoprotein of Borna disease virus mediates virus spread from cell to cell. *Cell Microbiol*, 18, 340-354.

LENNON, S. V., MARTIN, S. J. and COTTER, T. G. (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif*, 24, 203-214.

LEVRAT, C., LARRICK, J. W. and WRIGHT, S. C. (1991). Tumor necrosis factor induces activation of mitochondrial succinate dehydrogenase. *Life Sci*, 49, 1731-1737.

LICHT, B. G., LICHT, M. H., HARPER, K. M., LIN, S., CURTIN, J. J., HYSON, L. L. and WILLARD, K. (2002). Clinical presentations of naturally occurring canine seizures: similarities to human seizures. *Epilepsy Behav*, 3, 460-470.

- LIU, Z. G., HSU, H., GOEDEL, D. V. and KARIN, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, 87, 565-576.
- LUCAS, R., JUILLARD, P., DECOSTER, E., REDARD, M., BURGER, D., DONATI, Y., GIROUD, C., MONSO-HINARD, C., DE KESEL, T., BUURMAN, W. A., MOORE, M. W., DAYER, J. M., FIER, W., BLUETHMANN, H. and GRAU, G. E. (1997). Crucial role of tumor necrosis factor (TNF) receptor 2 and membrane-bound TNF in experimental cerebral malaria. *Eur J Immunol*, 27, 1719-1725.
- LUDWIG, H., BODE, L. and GOSZTONYI, G. (1988). Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol*, 35, 107-151.
- LUO, X. and HE, J. J. (2015). Cell-cell contact viral transfer contributes to HIV infection and persistence in astrocytes. *J Neurovirol*, 21, 66-80.
- MA, J. F., HUANG, Y., CHEN, S. D. and HALLIDAY, G. (2010). Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 36, 312-319.
- MAKINO, A., FUJINO, K., PARRISH, N. F., HONDA, T. and TOMONAGA, K. (2015). Borna disease virus possesses an NF-kB inhibitory sequence in the nucleoprotein gene. *Sci Rep*, 5, 8696.
- MANZANO, J., BERNAL, J. and MORTE, B. (2007). Influence of thyroid hormones on maturation of rat cerebellar astrocytes. *Int J Dev Neurosci*, 25, 171-179.
- MARAGAKIS, N. J., DYKES-HOBERG, M. and ROTHSTEIN, J. D. (2004). Altered expression of the glutamate transporter EAAT2b in neurological disease. *Ann Neurol*, 55, 469-477.
- MARCHETTI, L., KLEIN, M., SCHLETT, K., PFIZENMAIER, K. and EISEL, U. L. (2004). Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J Biol Chem*, 279, 32869-32881.
- MATSUMOTO, Y., HAYASHI, Y., OMORI, H., HONDA, T., DAITO, T., HORIE, M., IKUTA, K., FUJINO, K., NAKAMURA, S., SCHNEIDER, U., CHASE, G., YOSHIMORI, T., SCHWEMMLE, M. and TOMONAGA, K. (2012). Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe*, 11, 492-503.
- MAYER, D., FISCHER, H., SCHNEIDER, U., HEIMRICH, B. and SCHWEMMLE, M. (2005). Borna disease virus replication in organotypic hippocampal slice cultures from rats results in selective damage of dentate granule cells. *J Virol*, 79, 11716-11723.
- MCCARTHY, K. D. and DE VELLIS, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85, 890-902.
- MCCONKEY, D. J. (1998). Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*, 99, 157-168.

MCMAHON, J., HUANG, X., YANG, J., KOMATSU, M., YUE, Z., QIAN, J., ZHU, X. and HUANG, Y. (2012). Impaired autophagy in neurons after disinhibition of mammalian target of rapamycin and its contribution to epileptogenesis. *J Neurosci*, 32, 15704-15714.

MEDVEDEV, A. E., SUNDAN, A. and ESPEVIK, T. (1994). Involvement of the tumor necrosis factor receptor p75 in mediating cytotoxicity and gene regulating activities. *Eur J Immunol*, 24, 2842-2849.

MEEUWSEN, S., PERSON-DEEN, C., BSIBSI, M., RAVID, R. and VAN NOORT, J. M. (2003). Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia*, 43, 243-253.

MELO, A. S., AGUIAR, R. S., AMORIM, M. M., ARRUDA, M. B., MELO, F. O., RIBEIRO, S. T., BATISTA, A. G., FERREIRA, T., DOS SANTOS, M. P., SAMPAIO, V. V., MOURA, S. R., RABELLO, L. P., GONZAGA, C. E., MALINGER, G., XIMENES, R., DE OLIVEIRA-SZEJNFELD, P. S., TOVAR-MOLL, F., CHIMELLI, L., SILVEIRA, P. P., DELVECHIO, R., HIGA, L., CAMPANATI, L., NOGUEIRA, R. M., FILIPPIS, A. M., SZEJNFELD, J., VOLOCH, C. M., FERREIRA, O. C., JR., BRINDEIRO, R. M. and TANURI, A. (2016). Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. *JAMA Neurol*, 73, 1407-1416.

MELO, G. D. D., BRACHTHÄUSER, L., AHLEMEYER, B., BAUMGART-VOGT, B. and HERDEN, C. (2013). Borna Disease Virus Infection of TNF-transgenic Neuronal Cultures Promotes Astroglial Proliferation. *J Comp Pathol*, 1, 75.

MELZIG, M. and DIENWIEBEL, U. (1990). Is the estimation of the activity of MTT-reduction suitable for the determination of basal cytotoxicity? *Pharmazie*, 45, 515-517.

MERBL, Y., SOMMER, A., CHAI, O., AROCH, I., ZIMMERMAN, G., FRIEDMAN, A., SOREQ, H. and SHAMIR, M. H. (2014). Tumor necrosis factor- α and interleukin-6 concentrations in cerebrospinal fluid of dogs after seizures. *J Vet Intern Med*, 28, 1775-1781.

MICHAEL, B. D. and SOLOMON, T. (2012). Seizures and encephalitis: Clinical features, management, and potential pathophysiologic mechanisms. *Epilepsia*, 53, 63-71.

MICHEAU, O. and TSCHOPP, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114, 181-190.

MILLER, R. H. and RAFF, M. C. (1984). Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci*, 4, 585-592.

MISHRA, M. K., KOLI, P., BHOWMICK, S. and BASU, A. (2007). Neuroprotection conferred by astrocytes is insufficient to protect animals from succumbing to Japanese encephalitis. *Neurochem Int*, 50, 764-773.

MISRA, U. K., TAN, C. T. and KALITA, J. (2008). Viral encephalitis and epilepsy. *Epilepsia*, 49 Suppl 6, 13-18.

MORALES, J. A., HERZOG, S., KOMPETER, C., FRESE, K. and ROTT, R. (1988). Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol*, 177, 51-68.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.

- MUCKE, L., OLDSTONE, M. B., MORRIS, J. C. and NERENBERG, M. I. (1991). Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol*, 3, 465-474.
- NARAYAN, O., HERZOG, S., FRESE, K., SCHEEFERS, H. and ROTT, R. (1983). Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis*, 148, 305-315.
- NAUDE, P. J., DEN BOER, J. A., LUITEN, P. G. and EISEL, U. L. (2011). Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J*, 278, 888-898.
- NAUDE, P. J., DOBOS, N., VAN DER MEER, D., MULDER, C., PAWIRONADI, K. G., DEN BOER, J. A., VAN DER ZEE, E. A., LUITEN, P. G. and EISEL, U. L. (2014). Analysis of cognition, motor performance and anxiety in young and aged tumor necrosis factor alpha receptor 1 and 2 deficient mice. *Behav Brain Res*, 258, 43-51.
- NIBBER, A., CLOVER, L., PETTINGILL, P., WATERS, P., ELGER, C. E., BIEN, C. G., VINCENT, A. and LANG, B. (2016). Antibodies to AMPA receptors in Rasmussen's encephalitis. *Eur J Paediatr Neurol*, 20, 222-227.
- NOBACH, D., BOURG, M., HERZOG, S., LANGE-HERBST, H., ENCARNACAO, J. A., EICKMANN, M. and HERDEN, C. (2015). Shedding of infectious Borna disease virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. *PLoS One*, 10, e0137018.
- OBERHEIM, N. A., TIAN, G. F., HAN, X., PENG, W., TAKANO, T., RANSOM, B. and NEDERGAARD, M. (2008). Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci*, 28, 3264-3276.
- OBERHEIM, N. A., WANG, X., GOLDMAN, S. and NEDERGAARD, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*, 29, 547-553.
- OBERSTEIN, A., JEFFREY, P. D. and SHI, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-1 peptide complex: Bcl-1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem*, 282, 13123-13132.
- OLMOS, G. and LLADO, J. (2014). Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm*, 2014, 861231.
- ORTINSKI, P. I., DONG, J., MUNGENAST, A., YUE, C., TAKANO, H., WATSON, D. J., HAYDON, P. G. and COULTER, D. A. (2010). Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat Neurosci*, 13, 584-591.
- OVANESOV, M. V., AYHAN, Y., WOLBERT, C., MOLDOVAN, K., SAUDER, C. and PLETNIKOV, M. V. (2008a). Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *J Neuroinflammation*, 5, 50.
- OVANESOV, M. V., MOLDOVAN, K., SMITH, K., VOGEL, M. W. and PLETNIKOV, M. V. (2008b). Persistent Borna Disease Virus (BDV) infection activates microglia prior to a detectable loss of granule cells in the hippocampus. *J Neuroinflammation*, 5, 16.
- OVANESOV, M. V., SAUDER, C., RUBIN, S. A., RICHT, J., NATH, A., CARBONE, K. M. and PLETNIKOV, M. V. (2006). Activation of microglia by borna disease virus infection: in vitro study. *J Virol*, 80, 12141-12148.

- OVANESOV, M. V., VOGEL, M. W., MORAN, T. H. and PLETNIKOV, M. V. (2007). Neonatal Borna disease virus infection in rats is associated with increased extracellular levels of glutamate and neurodegeneration in the striatum. *J Neurovirol*, 13, 185-194.
- PALERMO, C. I., COSTANZO, C. M., FRANCHINA, C., CASTIGLIONE, G., GIULIANO, L., RUSSO, R., CONTI, A., SOFIA, V. and SCALIA, G. (2016). Focal epilepsy as a long term sequela of Parvovirus B19 encephalitis. *J Clin Virol*, 80, 20-23.
- PALMA, J. P., KWON, D., CLIPSTONE, N. A. and KIM, B. S. (2003). Infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus directly induces proinflammatory cytokines in primary astrocytes via NF-kappaB activation: potential role for the initiation of demyelinating disease. *J Virol*, 77, 6322-6331.
- PANG, Y., CAI, Z. and RHODES, P. G. (2001). Analysis of genes differentially expressed in astrocytes stimulated with lipopolysaccharide using cDNA arrays. *Brain Res*, 914, 15-22.
- PAPA, M., DE LUCA, C., PETTA, F., ALBERGHINA, L. and CIRILLO, G. (2014). Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. *Neurosci Biobehav Rev*, 42, 35-54.
- PELLERIN, L. and MAGISTRETTI, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 10625-10629.
- PETROVA, P., RAIBEKAS, A., PEVSNER, J., VIGO, N., ANAFI, M., MOORE, M. K., PEAIRE, A. E., SHRIDHAR, V., SMITH, D. I., KELLY, J., DUROCHER, Y. and COMMISSIONG, J. W. (2003). MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci*, 20, 173-188.
- PFEFFERKORN, C., KALLFASS, C., LIENENKLAUS, S., SPANIER, J., KALINKE, U., RIEDER, M., CONZELMANN, K. K., MICHIELS, T. and STAEHEL, P. (2015). Abortively infected astrocytes appear to represent the main source of interferon beta in the virus-infected brain. *J Virol*, 90, 2031-2038.
- PICKERING, M., CUMISKEY, D. and O'CONNOR, J. J. (2005). Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol*, 90, 663-670.
- PITKÄNEN, A. and LUKASIUK, K. (2011). Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *The Lancet Neurology*, 10, 173-186.
- PLANZ, O., PLESCHKA, S. and LUDWIG, S. (2001). MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J Virol*, 75, 4871-4877.
- PLANZ, O., PLESCHKA, S. and WOLFF, T. (2009). Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways. *Cell Microbiol*, 11, 872-879.
- PLESNILA, N., ZHU, C., CULMSEE, C., GROGER, M., MOSKOWITZ, M. A. and BLOMGREN, K. (2004). Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 24, 458-466.
- PLETNIKOV, M. V., RUBIN, S. A., SCHWARTZ, G. J., MORAN, T. H., SOBOTKA, T. J. and CARBONE, K. M. (1999). Persistent neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats. *Physiol Behav*, 66, 823-831.

- PLETNIKOV, M. V., RUBIN, S. A., VOGEL, M. W., MORAN, T. H. and CARBONE, K. M. (2002). Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. I. Brain pathology and behavioral deficits. *Brain Res*, 944, 97-107.
- POENISCH, M., BURGER, N., STAEHELI, P., BAUER, G. and SCHNEIDER, U. (2009). Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *J Virol*, 83, 4297-4307.
- POENISCH, M., UNTERSTAB, G., WOLFF, T., STAEHELI, P. and SCHNEIDER, U. (2004). The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *J Gen Virol*, 85, 1895-1898.
- POTOKAR, M., JORGACEVSKI, J. and ZOREC, R. (2016). Astrocyte aquaporin dynamics in health and disease. *Int J Mol Sci*, 17, 1121.
- PRAJEETH, C. K., LOHR, K., FLOESS, S., ZIMMERMANN, J., ULRICH, R., GUDI, V., BEINEKE, A., BAUMGÄRTNER, W., MÜLLER, M., HUEHN, J. and STANGEL, M. (2014). Effector molecules released by Th1 but not Th17 cells drive an M1 response in microglia. *Brain Behav Immun*, 37, 248-259.
- PRAT, C. M., SCHMID, S., FARRUGIA, F., CENAC, N., LE MASSON, G., SCHWEMMLE, M. and GONZALEZ-DUNIA, D. (2009). Mutation of the protein kinase C site in borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling and restores normal synaptic activity. *PLoS Pathog.*, 5, e1000425.
- PRINGLE, C. R. (1996). Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch Virol*, 141, 2251-2256.
- PROBERT, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, 302, 2-22.
- PROBERT, L., AKASSOGLU, K., KASSIOTIS, G., PASPARAKIS, M., ALEXOPOULOU, L. and KOLLIAS, G. (1997). TNF-alpha transgenic and knockout models of CNS inflammation and degeneration. *J Neuroimmunol*, 72, 137-141.
- PROBERT, L., AKASSOGLU, K., PASPARAKIS, M., KONTAGEORGOS, G. and KOLLIAS, G. (1995). Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11294-11298.
- PROW, N. A. and IRANI, D. N. (2008). The inflammatory cytokine, interleukin-1 beta, mediates loss of astroglial glutamate transport and drives excitotoxic motor neuron injury in the spinal cord during acute viral encephalomyelitis. *J Neurochem*, 105, 1276-1286.
- PYPER, J. M. and CLEMENTS, J. E. (1994). Partial purification and characterization of Borna disease virions released from infected neuroblastoma cells. *Virology*, 201, 380-382.
- RAHMAN, M. M. and MCFADDEN, G. (2006). Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog*, 2, e4.
- RASMUSSEN, T., OLSZEWSKI, J. and LLOYDSMITH, D. (1958). Focal seizures due to chronic localized encephalitis. *Neurology*, 8, 435-445.

- RAUERT, H., WICOVSKY, A., MULLER, N., SIEGMUND, D., SPINDLER, V., WASCHKE, J., KNEITZ, C. and WAJANT, H. (2010). Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem*, 285, 7394-7404.
- RAVIZZA, T., BALOSSO, S. and VEZZANI, A. (2011). Inflammation and prevention of epileptogenesis. *Neurosci Lett*, 497, 223-230.
- RAVIZZA, T., RIZZI, M., PEREGO, C., RICHICHI, C., VELISKOVA, J., MOSHE, S. L., DE SIMONI, M. G. and VEZZANI, A. (2005). Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia*, 46 Suppl 5, 113-117.
- RAY, N. B., POWER, C., LYNCH, W. P., EWALT, L. C. and LODMELL, D. L. (1997). Rabies viruses infect primary cultures of murine, feline, and human microglia and astrocytes. *Arch Virol*, 142, 1011-1019.
- REGAN, M. R., HUANG, Y. H., KIM, Y. S., DYKES-HOBERG, M. I., JIN, L., WATKINS, A. M., BERGLES, D. E. and ROTHSTEIN, J. D. (2007). Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J Neurosci*, 27, 6607-6619.
- RICHT, J. A., PFEUFFER, I., CHRIST, M., FRESE, K., BECHTER, K. and HERZOG, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis*, 3, 343-352.
- RICHT, J. A., SCHMEEL, A., FRESE, K., CARBONE, K. M., NARAYAN, O. and ROTT, R. (1994). Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med*, 179, 1467-1473.
- RICHT, J. A. and STITZ, L. (1992). Borna disease virus-infected astrocytes function in vitro as antigen-presenting and target cells for virus-specific CD4-bearing lymphocytes. *Arch Virol*, 124, 95-109.
- RICHTER, K., BAUR, K., ACKERMANN, A., SCHNEIDER, U., HAUSMANN, J. and STAEHEL, P. (2007). Pathogenic potential of borna disease virus lacking the immunodominant CD8 T-cell epitope. *J Virol*, 81, 11187-11194.
- RINDER, M., ACKERMANN, A., KEMPF, H., KASPERS, B., KORBEL, R. and STAEHEL, P. (2009). Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *J Virol*, 83, 5401-5407.
- ROTHE, J., LESSLAUER, W., LOTSCHER, H., LANG, Y., KOEBEL, P., KONTGEN, F., ALTHAGE, A., ZINKERNAGEL, R., STEINMETZ, M. and BLUETHMANN, H. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 364, 798-802.
- ROTHSTEIN, J. D., DYKES-HOBERG, M., PARDO, C. A., BRISTOL, L. A., JIN, L., KUNCL, R. W., KANAI, Y., HEDIGER, M. A., WANG, Y., SCHIELKE, J. P. and WELTY, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16, 675-686.
- ROTHSTEIN, J. D., MARTIN, L., LEVEY, A. I., DYKES-HOBERG, M., JIN, L., WU, D., NASH, N. and KUNCL, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, 13, 713-725.

- ROTHSTEIN, J. D., VAN KAMMEN, M., LEVEY, A. I., MARTIN, L. J. and KUNCL, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 38, 73-84.
- ROTT, R. and BECHT, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol*, 190, 17-30.
- SANTELLO, M., BEZZI, P. and VOLTERRA, A. (2011). TNFalpha controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron*, 69, 988-1001.
- SANTELLO, M. and VOLTERRA, A. (2012). TNFalpha in synaptic function: switching gears. *Trends Neurosci*, 35, 638-647.
- SAUDER, C. and STAEHEL, P. (2003). Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol*, 77, 12886-12890.
- SAVILL, J., FADOK, V., HENSON, P. and HASLETT, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14, 131-136.
- SAVIN, C., TRIESCH, J. and MEYER-HERMANN, M. (2009). Epileptogenesis due to glia-mediated synaptic scaling. *J R Soc Interface*, 6, 655-668.
- SCHAUDIEN, D. (2007). Experimentelle Infektion von TNF-transgenen Mäusen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit - Einfluss auf Zytokinprofil, Neurodegeneration und Neuroprotektion. Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie, PhD-These.
- SCHAUDIEN, D., KRAMER, K., EISEL, U., BAUMGÄRTNER, W. and HERDEN, C. (2006). Role of TNF and its receptor 1 and 2 in Borna disease virus infected TNF-transgenic mice. *Acta Neuropathol*, 112, 372.
- SCHINDLER, C. K., PEARSON, E. G., BONNER, H. P., SO, N. K., SIMON, R. P., PREHN, J. H. and HENSHALL, D. C. (2006). Caspase-3 cleavage and nuclear localization of caspase-activated DNase in human temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 583-589.
- SCHLOTTAU, K., HOFFMANN, B., HOMEIER-BACHMANN, T., FAST, C., ULRICH, R. G., BEER, M. and HOFFMANN, D. (2017a). Multiple detection of zoonotic variegated squirrel bornavirus 1 RNA in different squirrel species suggests a possible unknown origin for the virus. *Arch Virol*, doi: 10.1007/s00705-017-3432-z (ahead of print)
- SCHLOTTAU, K., JENCKEL, M., VAN DEN BRAND, J., FAST, C., HERDEN, C., HOPER, D., HOMEIER-BACHMANN, T., THIELEBEIN, J., MENSING, N., DIENDER, B., HOFFMANN, D., ULRICH, R. G., METTENLEITER, T. C., KOOPMANS, M., TAPPE, D., SCHMIDT-CHANASIT, J., REUSKEN, C. B., BEER, M. and HOFFMANN, B. (2017b). Variegated squirrel bornavirus 1 in squirrels, Germany and the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 23, 477-481.
- SCHMID, S., METZ, P., PRAT, C. M., GONZALEZ-DUNIA, D. and SCHWEMMLE, M. (2010). Protein kinase C-dependent phosphorylation of Borna disease virus P protein is required for efficient viral spread. *Arch Virol*, 155, 789-793.
- SCHMIDT, J. (1952). Die Bornakrankheit des Pferdes. 55 Jahre Forschung und Lehre. *Arch Exp Veterinärmed*, 6, 177-187.

- SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P. A., KIM, S. and LIPKIN, W. I. (1994). Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol*, 68, 6514-6522.
- SCHNEIDER, P. A., SCHNEEMANN, A. and LIPKIN, W. I. (1994). RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol*, 68, 5007-5012.
- SCHNEIDER, U., NAEGELE, M., STAEHEL, P. and SCHWEMMLE, M. (2003). Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol*, 77, 11781-11789.
- SCHWARDT, M., MAYER, D., FRANK, R., SCHNEIDER, U., EICKMANN, M., PLANZ, O., WOLFF, T. and SCHWEMMLE, M. (2005). The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J Gen Virol*, 86, 3163-3169.
- SCHWARTZ, J. P. and WILSON, D. J. (1992). Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia*, 5, 75-80.
- SCHWEMMLE, M., DE, B., SHI, L., BANERJEE, A. and LIPKIN, W. I. (1997). Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *J Biol Chem*, 272, 21818-21823.
- SCHWEMMLE, M., SALVATORE, M., SHI, L., RICHT, J., LEE, C. H. and LIPKIN, W. I. (1998). Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem*, 273, 9007-9012.
- SCORDEL, C., HUTTIN, A., COCHET-BERNOIN, M., SZELECHOWSKI, M., POULET, A., RICHARDSON, J., BENCHOUA, A., GONZALEZ-DUNIA, D., ELOIT, M. and COULPIER, M. (2015). Borna disease virus phosphoprotein impairs the developmental program controlling neurogenesis and reduces human GABAergic neurogenesis. *PLoS Pathog*, 11, e1004859.
- SEIFERT, G., CARMIGNOTO, G. and STEINHAUSER, C. (2010). Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev*, 63, 212-221.
- SHIMIZU, S., KANASEKI, T., MIZUSHIMA, N., MIZUTA, T., ARAKAWA-KOBAYASHI, S., THOMPSON, C. B. and TSUJIMOTO, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6, 1221-1228.
- SILVERMAN, M. A., MISASI, J., SMOLE, S., FELDMAN, H. A., COHEN, A. B., SANTAGATA, S., MCMANUS, M. and AHMED, A. A. (2013). Eastern equine encephalitis in children, Massachusetts and New Hampshire, USA, 1970-2010. *Emerg Infect Dis*, 19, 194-201.
- SINHA, S., PATIL, S. A., JAYALEKSHMY, V. and SATISHCHANDRA, P. (2008). Do cytokines have any role in epilepsy? *Epilepsy Res*, 82, 171-176.
- SYPE, J. C. and MOORE, R. Y. (1976). Astrocytic gap junctions in the rat lateral hypothalamic area. *Anat Rec*, 185, 247-251.
- SLEMMER, J. E., ZHU, C., LANDSHAMER, S., TRABOLD, R., GROHM, J., ARDESHIRI, A., WAGNER, E., SWEENEY, M. I., BLOMGREN, K., CULMSEE, C., WEBER, J. T. and PLESNILA, N. (2008). Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury. *Am J Pathol*, 173, 1795-1805.

- SMEAL, R. M., FUJINAMI, R., WHITE, H. S. and WILCOX, K. S. (2015). Decrease in CA3 inhibitory network activity during Theiler's virus encephalitis. *Neurosci Lett*, 609, 210-215.
- SMEAL, R. M., STEWART, K. A., IACOB, E., FUJINAMI, R. S., WHITE, H. S. and WILCOX, K. S. (2012). The activity within the CA3 excitatory network during Theiler's virus encephalitis is distinct from that observed during chronic epilepsy. *J Neurovirol*, 18, 30-44.
- SOFRONIEW, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-647.
- SOFRONIEW, M. V. and VINTERS, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119, 7-35.
- SOLBRIG, M. V., KOOB, G. F. and LIPKIN, W. I. (1996). Naloxone-induced seizures in rats infected with Borna disease virus. *Neurology*, 46, 1170-1171.
- SONG, J. H., BELLAIL, A., TSE, M. C., YONG, V. W. and HAO, C. (2006). Human astrocytes are resistant to Fas ligand and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *J Neurosci*, 26, 3299-3308.
- SONG, W., KAO, W., ZHAI, A., QIAN, J., LI, Y., ZHANG, Q., ZHAO, H., HU, Y., LI, H. and ZHANG, F. (2013). Borna disease virus nucleoprotein inhibits type I interferon induction through the interferon regulatory factor 7 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 438, 619-623.
- SRIRAM, K. and O'CALLAGHAN, J. P. (2007). Divergent roles for tumor necrosis factor- α in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2, 140-153.
- STAEHEL, P., SAUDER, C., HAUSMANN, J., EHRENSPERGER, F. and SCHWEMMLE, M. (2000). Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol*, 81, 2123-2135.
- STELLWAGEN, D., BEATTIE, E. C., SEO, J. Y. and MALENKA, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci*, 25, 3219-3228.
- STELLWAGEN, D. and MALENKA, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440, 1054-1059.
- STEWART, K. A., WILCOX, K. S., FUJINAMI, R. S. and WHITE, H. S. (2010). Development of postinfection epilepsy after Theiler's virus infection of C57BL/6 mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 1210-1219.
- STITZ, L., BILZER, T. and PLANZ, O. (2002). The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci*, 7, d541-555.
- SUBERBIELLE, E., STELLA, A., PONT, F., MONNET, C., MOUTON, E., LAMOUREUX, L., MONSARRAT, B. and GONZALEZ-DUNIA, D. (2008). Proteomic analysis reveals selective impeding of neuronal remodeling upon Borna disease virus infection. *J Virol*, 82, 12265-12279.
- SUSIN, S. A., DAUGAS, E., RAVAGNAN, L., SAMEJIMA, K., ZAMZAMI, N., LOEFFLER, M., COSTANTINI, P., FERRI, K. F., IRINOPOULOU, T., PREVOST, M. C., BROTHERS, G., MAK, T. W., PENNINGER, J., EARNSHAW, W. C. and KROEMER, G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 192, 571-580.

- SUZUKI, Y., KOBAYASHI, Y., HORIE, M. and TOMONAGA, K. (2014). Origin of an endogenous bornavirus-like nucleoprotein element in thirteen-lined ground squirrels. *Genes Genet Syst*, 89, 143-148.
- TAKAKI, J., FUJIMORI, K., MIURA, M., SUZUKI, T., SEKINO, Y. and SATO, K. (2012). L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 9, 275.
- TAKANASHI, J., TSUJI, M., AMEMIYA, K., TADA, H. and BARKOVICH, A. J. (2007). Mild influenza encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *J Neurol Sci*, 256, 86-89.
- TAKASAKI, Y., DENG, J. S. and TAN, E. M. (1981). A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med*, 154, 1899-1909.
- TAKEUCHI, H., JIN, S., WANG, J., ZHANG, G., KAWANOKUCHI, J., KUNO, R., SONOBE, Y., MIZUNO, T. and SUZUMURA, A. (2006). Tumor necrosis factor- α induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*, 281, 21362-21368.
- TANAKA, K., WATASE, K., MANABE, T., YAMADA, K., WATANABE, M., TAKAHASHI, K., IWAMA, H., NISHIKAWA, T., ICHIHARA, N., KIKUCHI, T., OKUYAMA, S., KAWASHIMA, N., HORI, S., TAKIMOTO, M. and WADA, K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*, 276, 1699-1702.
- TANI, E., NISHIURA, M. and HIGASHI, N. (1973). Freeze-fracture studies of gap junctions of normal and neoplastic astrocytes. *Acta Neuropathol*, 26, 127-138.
- TAVERNA, E., GOTZ, M. and HUTTNER, W. B. (2014). The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 465-502.
- THEODORE, W. H., EPSTEIN, L., GAILLARD, W. D., SHINNAR, S., WAINWRIGHT, M. S. and JACOBSON, S. (2008). Human herpes virus 6B: a possible role in epilepsy? *Epilepsia*, 49, 1828-1837.
- TILLEUX, S. and HERMANS, E. (2008). Down-regulation of astrocytic GLAST by microglia-related inflammation is abrogated in dibutyl cAMP-differentiated cultures. *J Neurochem*, 105, 2224-2236.
- TIZARD, I., BALL, J., STOICA, G. and PAYNE, S. (2016). The pathogenesis of bornaviral diseases in mammals. *Anim Health Res Rev*, 17, 92-109.
- TOMONAGA, K., KOBAYASHI, T., LEE, B. J., WATANABE, M., KAMITANI, W. and IKUTA, K. (2000). Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 12788-12793.
- TORNATORE, C., CHANDRA, R., BERGER, J. R. and MAJOR, E. O. (1994). HIV-1 infection of subcortical astrocytes in the pediatric central nervous system. *Neurology*, 44, 481-487.

TRINKA, E., COCK, H., HESDORFFER, D., ROSSETTI, A. O., SCHEFFER, I. E., SHINNAR, S., SHORVON, S. and LOWENSTEIN, D. H. (2015). A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, 56, 1515-1523.

TROTTI, D., DANBOLT, N. C. and VOLTERRA, A. (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci*, 19, 328-334.

UNTERSTAB, G., LUDWIG, S., ANTON, A., PLANZ, O., DAUBER, B., KRAPPMANN, D., HEINS, G., EHRHARDT, C. and WOLFF, T. (2005). Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 13640-13645.

UNTIET, V., KOVERMANN, P., GERKAU, N. J., GENSCH, T., ROSE, C. R. and FAHLKE, C. (2017). Glutamate transporter-associated anion channels adjust intracellular chloride concentrations during glial maturation. *Glia*, 65, 388-400.

UPTON, J. W., KAISER, W. J. and MOCARSKI, E. S. (2010). Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe*, 7, 302-313.

VAHLENKAMP, T. W., KONRATH, A., WEBER, M. and MÜLLER, H. (2002). Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol*, 76, 9735-9743.

VANDEN BERGHE, T., KAISER, W. J., BERTRAND, M. J. and VANDENABEELE, P. (2015). Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol Cell Oncol*, 2, e975093.

VANDELDELDE, M., HIGGINS, R. J. and OEVERMANN, A. (2012). General Neuropathology. In: *Veterinary Neuropathology: Essentials of Theory and Practice*. Vandevelde, M., Higgins, R. J., Oevermann, A. Wiley-Blackwell, Chichester, UK: 1-37.

VATTEMI, G., MARINI, M., FERRERI, N. R., HAO, S., MALATESTA, M., MENEGUZZI, A., GUGLIELMI, V., FAVA, C., MINUZ, P. and TOMELLERI, G. (2013). Overexpression of TNF- α in mitochondrial diseases caused by mutations in mtDNA: evidence for signaling through its receptors on mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 63, 108-114.

VERBOON-MACIOLEK, M. A., KREDIET, T. G., GERARDS, L. J., DE VRIES, L. S., GROENENDAAL, F. and VAN LOON, A. M. (2008). Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*, 27, 241-245.

VERCAMMEN, D., VANDENABEELE, P., DECLERCQ, W., VAN DE CRAEN, M., GROOTEN, J. and FIERIS, W. (1995). Cytotoxicity in L929 murine fibrosarcoma cells after triggering of transfected human p75 tumour necrosis factor (TNF) receptor is mediated by endogenous murine TNF. *Cytokine*, 7, 463-470.

VERKHRATSKY, A. and KIRCHHOFF, F. (2007). Glutamate-mediated neuronal-glial transmission. *J Anat*, 210, 651-660.

VERKHRATSKY, A. and PARPURA, V. (2010). Recent advances in (patho)physiology of astroglia. *Acta Pharmacol Sin*, 31, 1044-1054.

VEZZANI, A., FRENCH, J., BARTFAI, T. and BARAM, T. Z. (2011a). The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*, 7, 31-40.

- VEZZANI, A., FUJINAMI, R. S., WHITE, H. S., PREUX, P. M., BLUMCKE, I., SANDER, J. W. and LÖSCHER, W. (2016a). Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol*, 131, 211-234.
- VEZZANI, A., LANG, B. and ARONICA, E. (2016b). Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6, a022699.
- VEZZANI, A., MAROSO, M., BALOSSO, S., SANCHEZ, M. A. and BARTFAI, T. (2011b). IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain Behav Immun*, 25, 1281-1289.
- VIENENKÖTTER, J., EISEL, U. L., CULMSEE, C., HIRZ, M. and HERDEN, C. (2016). Untersuchung der Rolle von Lipocalin-2 in viral induzierten neuroinflammatorischen Prozessen an BDV-infizierten TNF-transgenen und TNF-Rezeptor-knockout-Mäusen. *Tierärztl Prax*, 3, A34.
- VINTERS, H. V., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K. (2015). General pathology of the central nervous system. In: *Greenfield's Neuropathology*. Love, S., Budka, H., Ironside, J. W., Perry, A. (Hrsg.), CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA: 1-58.
- VIRAG, L., ROBASZKIEWICZ, A., RODRIGUEZ-VARGAS, J. M. and OLIVER, F. J. (2013). Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med*, 34, 1153-1167.
- VOLK, H. A. (2015). International Veterinary Epilepsy Task Force consensus reports on epilepsy definition, classification and terminology, affected dog breeds, diagnosis, treatment, outcome measures of therapeutic trials, neuroimaging and neuropathology in companion animals. *BMC Vet Res*, 11, 174.
- VOLMER, R., MONNET, C. and GONZALEZ-DUNIA, D. (2006). Borna disease virus blocks potentiation of presynaptic activity through inhibition of protein kinase C signaling. *PLoS Pathog*, 2, e19.
- VOLMER, R., PRAT, C. M., LE MASSON, G., GARENNE, A. and GONZALEZ-DUNIA, D. (2007). Borna disease virus infection impairs synaptic plasticity. *J Virol*, 81, 8833-8837.
- VON LENHOSSÉK, M. (1891). Zur Kenntnis der Neuroglia des menschlichen Rückenmarkes. *Verh Anat Ges*, 5, 193-221.
- WAJANT, H. and SCHEURICH, P. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *FEBS J*, 278, 862-876.
- WANG, C., ZHOU, R., ZHANG, Z., JIN, Y., CARDONA, C. J. and XING, Z. (2015). Intrinsic apoptosis and proinflammatory cytokines regulated in human astrocytes infected with Enterovirus 71. *J Gen Virol*, 96, 3010-3022.
- WANG, C. C., FANG, K. M., YANG, C. S. and TZENG, S. F. (2009). Reactive oxygen species-induced cell death of rat primary astrocytes through mitochondria-mediated mechanism. *J Cell Biochem*, 107, 933-943.
- WANG, C. Y., MAYO, M. W., KORNELUK, R. G., GOEDDEL, D. V. and BALDWIN, A. S., JR. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281, 1680-1683.

- WANG, H., SHIMOJI, M., YU, S. W., DAWSON, T. M. and DAWSON, V. L. (2003). Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 132-139.
- WANG, J., CHUN, H. J., WONG, W., SPENCER, D. M. and LENARDO, M. J. (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 13884-13888.
- WANG, X., SHA, L., SUN, N., SHEN, Y. and XU, Q. (2016). Deletion of mTOR in reactive astrocytes suppresses chronic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Mol Neurobiol*, 54, 175-187.
- WASTERLAIN, C. G., FUJIKAWA, D. G., PENIX, L. and SANKAR, R. (1993). Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. *Epilepsia*, 34 Suppl 1, 37-53.
- WATANABE, M., INOUE, Y., SAKIMURA, K. and MISHINA, M. (1993). Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol*, 338, 377-390.
- WEINBERG, M. S., BLAKE, B. L. and MCCOWN, T. J. (2013). Opposing actions of hippocampus TNF α receptors on limbic seizure susceptibility. *Exp Neurol*, 247, 429-437.
- WEISSENBOCK, H., BAGO, Z., KOLODZIEJEK, J., HAGER, B., PALMETZHOFFER, G., DÜRRWALD, R. and NOWOTNY, N. (2017). Infections of horses and shrews with Bornaviruses in Upper Austria: a novel endemic area of Borna disease. *Emerg Microbes Infect*, 6, e52.
- WEISSENBOCK, H., HORNIG, M., HICKEY, W. F. and LIPKIN, W. I. (2000). Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathol*, 10, 260-272.
- WELLS, G. A., SCOTT, A. C., JOHNSON, C. T., GUNNING, R. F., HANCOCK, R. D., JEFFREY, M., DAWSON, M. and BRADLEY, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 121, 419-420.
- WELLS, G. A. and WELLS, M. (1989). Neuropil vacuolation in brain: a reproducible histological processing artefact. *J Comp Pathol*, 101, 355-362.
- WERNER-KEIß, N. (2006). Untersuchungen zur Expression von Strukturproteinen des Virus der Bornaschen Krankheit an intrazerebral infizierten Lewis-Ratten. Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie, Inaugural Dissertation.
- WERNER-KEIß, N., GARTEN, W., RICHT, J. A., POROMBKA, D., ALGERMISSEN, D., HERZOG, S., BAUMGÄRTNER, W. and HERDEN, C. (2008). Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 34, 590-602.
- WETHERINGTON, J., SERRANO, G. and DINGLELINE, R. (2008). Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron*, 58, 168-178.
- WILLIAMS, B. L., HORNIG, M., YADDANAPUDI, K. and LIPKIN, W. I. (2008). Hippocampal poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and caspase 3 activation in neonatal bornavirus infection. *J Virol*, 82, 1748-1758.

- WONG, G. H., BARTLETT, P. F., CLARK-LEWIS, I., BATTYE, F. and SCHRADER, J. W. (1984). Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature*, 310, 688-691.
- WU, H. M., HUANG, C. C., CHEN, S. H., LIANG, Y. C., TSAI, J. J., HSIEH, C. L. and HSU, K. S. (2003). Herpes simplex virus type 1 inoculation enhances hippocampal excitability and seizure susceptibility in mice. *Eur J Neurosci*, 18, 3294-3304.
- WU, Y. J., SCHULZ, H., LIN, C. C., SAAR, K., PATONE, G., FISCHER, H., HUBNER, N., HEIMRICH, B. and SCHWEMMLE, M. (2013). Borna disease virus-induced neuronal degeneration dependent on host genetic background and prevented by soluble factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 1899-1904.
- XU, X., NASH, P., MCFADDEN, G. (2000). Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. *Virus Genes*, 21:97-109.
- YANG, X., WANG, S., LIN, Y., HAN, Y., QIU, X., ZHAO, X., CAO, L., WANG, X. and CHI, Z. (2013). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition protects epileptic hippocampal neurons from apoptosis via suppressing Akt-mediated apoptosis-inducing factor translocation in vitro. *Neuroscience*, 231, 353-362.
- YORK, J. L., MADDOX, L. C., ZIMNIAK, P., MCHUGH, T. E. and GRANT, D. F. (1998). Reduction of MTT by glutathione S-transferase. *BioTechniques*, 25, 622-624, 626-628.
- ZAMANIAN, J. L., XU, L., FOO, L. C., NOURI, N., ZHOU, L., GIFFARD, R. G. and BARRES, B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*, 32, 6391-6410.
- ZELL, R., GECK, P., WERDAN, K. and BOEKSTEGERS, P. (1997). TNF-alpha and IL-1 alpha inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes: evidence for primary impairment of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem*, 177, 61-67.
- ZHANG, G., KOBAYASHI, T., KAMITANI, W., KOMOTO, S., YAMASHITA, M., BABA, S., YANAI, H., IKUTA, K. and TOMONAGA, K. (2003). Borna disease virus phosphoprotein represses p53-mediated transcriptional activity by interference with HMGB1. *J Virol*, 77, 12243-12251.
- ZHANG, L., LI, L., WANG, B., QIAN, D. M., SONG, X. X. and HU, M. (2014). HCMV induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in human fetal astrocytes. *Neurochem Res*, 39, 2407-2418.
- ZHENG, L., CALENOFF, M. A. and DAL CANTO, M. C. (2001). Astrocytes, not microglia, are the main cells responsible for viral persistence in Theiler's murine encephalomyelitis virus infection leading to demyelination. *J Neuroimmunol*, 118, 256-267.
- ZHOU, W. and YUAN, J. (2014). Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 35, 14-23.
- ZHU, C., WANG, X., HUANG, Z., QIU, L., XU, F., VAHSEN, N., NILSSON, M., ERIKSSON, P. S., HAGBERG, H., CULMSEE, C., PLESNILA, N., KROEMER, G. and BLOMGREN, K. (2007). Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ*, 14, 775-784.
- ZLOTNIK, I. (1968). The reaction of astrocytes to acute virus infections of the central nervous system. *Br J Exp Pathol*, 49, 555-564.

ZOU, J., WANG, Y. X., DOU, F. F., LU, H. Z., MA, Z. W., LU, P. H. and XU, X. M. (2010). Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int*, 56, 577-584.

ZOU, J. Y. and CREWS, F. T. (2005). TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Res*, 1034, 11-24.

ZSURKA, G. and KUNZ, W. S. (2015). Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *Lancet Neurol*, 14, 956-966.

ZUZA, A. L., BARROS, H. L., DE MATTOS SILVA OLIVEIRA, T. F., CHAVEZ-PAVONI, J. H. and ZANON, R. G. (2016). Astrocyte response to St. Louis encephalitis virus. *Virus Res*, 217, 92-100.

ZWICK, W. (1939). Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere. In: *Handbuch der Viruskrankheiten*, Gildemeister, E., Haagen, E., Waldmann, O. (Hrsg), Gustav Fischer Verlag, Jena: 254-356.

8. ANHANG

8.1 LÖSUNGEN UND PUFFER

8.1.1. Immunhistologie und Immunfluoreszenz

Tris-buffered saline (TBS), pH 7,6

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCl

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl auf 7,6.

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung

900 ml NaCl 0,8 % in Aqua dest.

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 7,6.

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol

1000 ml Aqua dest.

500 ml 0,1 M HCl

Einstellen des pH-Wertes mit 0,1 N HCl auf 7,1.

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB)

100 mg DAB

200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)

Mit Magnetrührer mischen und mit Filterpapier (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) filtrieren.

Unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30 %iges H₂O₂ zugeben.

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)

Stammlösung A:

0,1 M Zitronensäure (21,01 g C₆H₈O₇, in 1000 ml Aqua dest.)

Stammlösung B:

0,1 M Natriumzitrat (29,41 g C₆H₅Na₃O₇ x H₂O, in 1000 ml Aqua dest.)

9 ml Stammlösung A mit 41 ml Stammlösung B mischen.

450 ml Aqua dest. zugeben und mit 0,1 N HCl auf pH 6,0 einstellen.

Kardasewitsch

Stammlösung:

200 ml 25 % Ammoniaklösung

800 ml 70 % Ethanol

Gebrauchslösung:

5 ml Stammlösung + 175 ml 70 % Ethanol pro Küvette

Papanicolaou Gebrauchslösung

Papanicolaou Hämatoxylin 1b mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnen und filtrieren.

4 %iges Paraformaldehyd (PFA) in DMEM, pH 7,35-7,4

10 g PFA

250 ml DMEM (1g/L D-Glukose)

Auf Magnetrührer bei ca. 60-70°C lösen, nicht autoklavieren.

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 7,35-7,4.

8.1.2. Glutamat- und TNF-Behandlung

Glutamat-Gebrauchslösung

Stammlösung (1 M):

0,169 g L-Glutamic acid monosodium salt hydrate (Molekulargewicht 169,11 g/mol)
10 ml PBS
Für 5 mM Glutamatlösung:
0,5 ml Stammlösung in 10 ml DMEM (1 g/L D-Glukose)
Für 50 mM Glutamatlösung:
4 ml Stammlösung in 8 ml DMEM (1 g/L D-Glukose)

TNF-Gebrauchslösung

Stammlösung (0,1 mg/ml):
5 µg murines TNFα
50 µl steriles H₂O
Bei -18°C lagern.
Für 0,5 ng/ml TNF:
0,25 µl TNF Stammlösung
50 ml DMEM (1 g/L D-Glukose)
Für 1 ng/ml TNF:
0,5 µl TNF Stammlösung
50 ml DMEM (1 g/L D-Glukose)
Für 5 ng/ml TNF:
0,625 µl TNF Stammlösung
12,5 ml DMEM (1 g/L D-Glukose)
Für 10 ng/ml TNF:
1,25 µl TNF Stammlösung
12,5 ml DMEM (1 g/L D-Glukose)

8.1.3. MTT-Assay

Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,6

Gebrauchslösung (für 5000 ml)
0,72 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)
2,635 g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O)
45 g Natriumchlorid (NaCl)
Autoklavieren und Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 7,6.

MTT-Lösung

Stammlösung (5 mg/ml):
250 mg 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)
50 ml steriles PBS
Auf Magnetrührer lösen, bei -18°C lagern.
Gebrauchslösung frisch ansetzen:
2 ml MTT-Stammlösung
20 ml DMEM (1 g/L D-Glukose)

8.2 BEZUGSQUELLEN

Abcam Cambridge, UK

Kaninchen anti-LC3 A/B (ab58610)

B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Omnifix®-F Feindosierspritze (9161406V)
Sterican® Mix, stumpfe Kanüle ohne Anschliff, 21 G (9180109)

BD Falcon™ über Corning, Amsterdam, Niederlande

96-Well Tissue Culture Plate, flat bottom (353072)
24-Well Tissue Culture Plate, flat bottom (353226)

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; jetzt Weiss Pharmatechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Laminar Flow Sicherheitswerkbank (BDK-SK1500)

Biochrom GmbH, Berlin

Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml, L7240)

Biomed Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim

Thermocycler 60

Bioscape, Castrop-Rauxel

Bio. A.S.® Käfig Typ III (3010033)

Bio. A.S.® Filterdeckel Typ III (5010907)

Gitterdeckel für Käfig Typ III (5023483)

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Multicycler® PTC 200

Midori Green Advance (617004)

BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim

Parafilm® M Verschlussfolie (701605)

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Citronensäure ≥ 99,5 %, p.a., ACS, wasserfrei (X863.2)

DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole; 6335.1)

Deckgläser 20 x 60 mm (H878)

Eosin G (7089.2)

Ethanol vergällt ≥ 99,8 %, mit ca. 1 % MEK (K928.2)

Formaldehydlösung säurefrei ≥ 37 %, für die Histologie (P733.3)

Formamid ≥ 99,5 %, p.a. (6749.1)

Formamid deionisiert ≥ 99,5 %, BioScience-Grade, RNase/DNase-frei (P040.1)

Hämalaunlösung sauer nach Mayer (T865.3)

Heparin Natriumsalz (7692.1)

Hydrogen Peroxide 30 % (8070.1)

Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99 %, p.a., ACS (3904.1)

Magnesiumchlorid Hexahydrat ≥ 99 %, p.a., ACS (2189.2)

Methanol Rotipuran® ≥ 99,9 %, p.a., ACS, ISO (Art. 4627.3)

Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99 %, Ph.Eur., USP (P029.3)

Natriumhydrogencarbonat ≥ 99 %, Ph.Eur., reinst (8551.1)

Natriumhydrogenphosphat ≥ 99 %, p.a., ACS, wasserfrei (P030.2)

Natriumhydroxid ≥ 99 %, p.a., ISO, in Plättchen (6771.1)

Paraffin Roti®-Plast, für die Histologie (6642.5)

Paraformaldehyd reinst. (0335.3)

Propanol ≥ 99,5 %, zur Synthese (9866.3)

Ribonuklease A 90 U/mg (7156.1)

RNase away® (A998.1)

Roti®-Histol (6640.1)

Salzsäure (HCl) rauchend 37 % (2607.2)

Triethanolamin (6300.1)

Tris, Pufferan® ≥ 99,9 %, p.a. (4855.2)

Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran® p.a., ISO, stabilisiert (8070.1)

Carl Zeiss West Germany, jetzt: Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

Stereomikroskop (4772992)

Cell-Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA über New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Kaninchen anti-Cleaved Caspase 3 (Asp175 #9661)

Dako A/S, Glostrup, Dänemark

Dako Pen (S2002)

Kaninchen anti-Glial Fibrillar Acidic Protein (Z0334)

Maus anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (M0879)

Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction (X0936)

Schwein anti Kaninchen IgG (Z0196)

Dunn Labortechnik GmbH, Asbach

Multitest-Objekträger, 10 Kreise à 6 mm (40-410-06)

Eppendorf AG, Hamburg

Zentrifuge (5415C)

DNA LoBind® Tubes, 1,5 ml (30108051)

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

Primersynthese

Fermentas Life Sciences GmbH, St. Leon-Rot; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

dNTP Mix, 10 µM (R0192)

RiboLock™ RNase Inhibitor (E00382)

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Zellkulturschale Cellstar Cell Culture Dishes, Durchmesser 35 mm (627160)

Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz über CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe

Hamilton RN-Nadeln, 26 G, 5 mm, pst. 4 (Sonderanfertigung)

10 µl Microliter Spritze, Modell 701 RWSYR (7635-01)

Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Zentrifuge Labofuge 400R

ICN Biomedicals GmbH, Eschwege

EIA-Programm, Version 3.10

Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA über Dianova GmbH, Hamburg

Kaninchen IgG anti-Ziege IgG (H+L), Cy3 (305-165-003)

Kaninchen Peroxidase anti-Peroxidase (323-005-024)

Bovines Serumalbumin (IgG-frei, Protease-frei; 001-000-162)

Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L), Cy2 (111-225-003)

Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L), Cy3 (115-165-151)

Ziege IgG anti-Meerschweinchen IgG (H+L), Cy2 (106-225-003)

Jena Bioscience GmbH, Jena

Taq Pol, thermostabile DNA Polymerase (PCR-202L)

LASvendi GmbH, Soest

LASQCdiet®Rod16-R

LASQCdiet®Rod18-R

Merck KGaA (Merck Millipore), Darmstadt

Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices (UFC503096)

Entellan® in Toluol (107960)

Meerschweinchen anti-Glutamat Transporter 1 (GLT1, AB1783)

Meerschweinchen anti-Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST, AB1782)

Natronlauge Titrisol® 1 mol/l (1N; 1.09956.0001)

Papanicolaou Lösung 1b Hämatoxylinlösung S (1.09254.0500)

Salzsäure Titrisol® 1 mol/l (1N; 1.09970.0001)

Tri-Natriumcitrat (1.11037.1000)

Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn

Dimethylsulfoxid, ≥ 99 % (8.02912.1000)

Motic Deutschland GmbH, Wetzlar

Moticam 3 (1.100.600.100.621)

New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA; jetzt Eppendorf AG, Hamburg

Innova™ 2000 Platform Shaker (M1190-0002)

Nikon GmbH, Düsseldorf

Inverses Mikroskop Eclipse TS100
Eclipse 80i

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Donor Horse Serum (B15-023)
Gentamicin 10 mg/ml (P11-004)
Goat Serum (B11-035)
Porcine Serum (B15-030)

PeproTech GmbH, Hamburg

Recombinant murine TNF- α (315-01A)

Qiagen GmbH, Hilden

Puregene® Core Kit A (1042601)
Puregene® Proteinase K (158918)
RNase-Free DNase Set (50; 79254)
Rotor-Gene® SYBR Green® PCR Kit (204074)
Rotor-Gene® Q (9001586)

R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen

SuperFrost® Plus Objektträger (03-0060)

Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim

RNase A (1119915)

Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

Tissue-Tek® O.C.T.™ Einbettmedium (4583)
Tissue-Tek® SCA™ Eindeckfilm (4770)
Tissue-Tek® TEC™ 5 Paraffinausgießstation mit Kühlplatte (5229)
Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr. Gewebereinbettungsautomat (5905)
Tissue-Tek® Coverslipper (4765)

Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, TX, USA

Ziege anti-AIF (D-20, sc-9416)
Ziege anti-TNF-R1 (E-20, sc-1070)
Ziege anti-TNF-R2 (L-20, sc-1074)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Biosphere® Filter Tips 0.5 - 20 μ l (701.116.210)
Biosphere® Filter Tips 2 - 100 μ l (70.760.212)
Biosphere® Filter Tips 2 - 200 μ l (70.760.211)
Biosphere® Filter Tips 1250 μ l extra long (701.186.210)
Röhre 13 ml 101 x 16,5 mm (60.540.014)
Röhre 15 ml 120 x 17 mm (62.554.502)
Röhre 50 ml 114 x 28 mm (62.547.254)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml (72.706)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml (72.695.500)
Zellkulturfflasche 25 cm² Kulturfläche (833.910.002)

SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn

Xylol reinst (XTR-10000-97-1)
Ethanol 96 %, vergällt (ETO-10000-96-1)

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Triton® X-100 rein (37240)

Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA

3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate ≥ 96 % (DAB; D5637-50G)
Cell dissociation sieve-Tissue Grinder Kit®, Kat.-Nr.: CD1-1KT

ANHANG

Imidazole puriss. p.a., $\geq 99,5\%$ (GC; 56750)
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT; N6639)
Levamisol (Tetramisole hydrochloride) (L9756)
L-Glutamic acid monosodium salt hydrate, $\geq 99\%$ (G1626-100G)
Paraformaldehyd (158127)
Screen 200 Mesh (wire diameter: 0,053 mm; opening size 73,7 μm), Kat.-Nr.: S4145-5EA
Sheep Serum (S2263)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (M2128-1G)

Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Gudensberg
Süsse Objektträger (11238A)

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA (früher: Gibco®, Invitrogen™, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA)

Deoxyribonuclease II from bovine spleen (D8764)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), low glucose, pyruvate (31885023)
Heat inactivated fetal bovine serum (10500)
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml; 15140-122)
Nanodrop 2000 Spektralphotometer
Färbeautomat Microm HMS 740
Slide Rack (1009-8889)
Trypsin-EDTA 0,25 % (25200056)

Thermo Scientific (Thermo Shandon Limited), Runcorn, UK; jetzt: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Cassette Rack Assy (73310017)
Shandon Coverplate™ (72110017)
Titertek Multiskan® PLUS MKII

Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Avidin-Biotin-Komplex: Vectastain® ABC-Kit Peroxidase Standard (PK-4000)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), biotinyliert (BA-1000)
Ziege anti-Meerschweinchen IgG (H+L), biotinyliert (BA-7000)
Pferd anti-Ziege IgG (H+L), biotinyliert (BA-9500)
Pferd anti-Maus IgG (H+L), biotinyliert (BA-2000)

8.3. TABELLEN /IN VIVO UNTERSUCHUNGEN

8.3.1. Score Sheet Mäuse

Blatt 1 Maus ID:		Versuchsbeginn (Datum/Uhrzeit):				Ausgangsgewicht:				Geburtsdatum:								
Eingriff																		
Verlauf		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15	
Kriterium																		
Körpergewicht																		
Allgemeinzustand																		
Spontanverhalten																		
SUMME																		
Score																		
Bemerkung																		
Unter-sucher																		

(usw.)

Punktwertung	0	1	5	10	20
Körpergewicht (Beurteilt wird der Gewichtsverlust innerhalb von 1 Woche, Bestimmung alle 7 Tage ab einem Alter von 21 Tagen, zu früheren Zeitpunkten nur die gemäß dem Versuchsplan zur Euthanasie bestimmten Tiere)	0-5 % Abweichung zur jeweiligen Wachstumskurve der Kontrollgruppe	5-10 % Abweichung zur jeweiligen Wachstumskurve der Kontrollgruppe	10-20 % Abweichung zur jeweiligen Wachstumskurve der Kontrollgruppe	20-25 % Abweichung zur jeweiligen Wachstumskurve der Kontrollgruppe	> 25 % Abweichung zur jeweiligen Wachstumskurve der Kontrollgruppe
Allgemeinzustand (Tägliche Bewertung, bis zu einem Alter von 21 Tagen nur adspektorisch, ohne Herausnehmen des Tieres)	Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend	Fell geringgradig gesträubt, verminderte oder übersteigerte Körperpflege	Fell stumpf, ungeordnet; ungepflegte Körperöffnungen; Augen trüb; erhöhter Muskeltonus	Fokal verklebtes Fell; unnormale Haltung; Augen trüb; hoher Muskeltonus	Struppiges, rauhes Fell; aufgekrümmter Rücken; abnorme Kopf- und Gliedmaßenhaltung
Spontanverhalten	Normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	Geringgradige Abweichungen vom Normalverhalten	Geringgradige Aktivitätsveränderungen (Hyperaktivität/Hypoaktivität); mechanisches Nasewischen	Mittelgradige Aktivitätsveränderungen; bei manueller Manipulation fokale Krämpfe; Selbstisolation, aggressives Verhalten gegenüber Käfiggenossen, Koordinationsstörungen	Moribunder Zustand; bei manueller Manipulation spontan auftretende generalisierte Krämpfe; Paralyse/Parese; Somnolenz; Lethargie; Ataxie und Torticollis

Die obigen Kriterien sind in Anlehnung an die klinischen Bewertungen in den Studien von Hausmann und Kramer entstanden (HAUSMANN *et al.*, 2001; KRAMER, 2006) und führen, für jedes Versuchstier über den gesamten Versuchszeitraum individuell bestimmt, zum Abbruch des Versuchs und zur Euthanasie. Die Tiere werden täglich zur gleichen Tageszeit kontrolliert. Das Wiegen findet alle 7 Tage ab einem Alter von 21 Tagen statt, da sonst die Gefahr der Abstoßung durch das Muttertier zu groß ist.

Bewertung und Maßnahme Punktesumme (Gesamtscore)	Belastungsgrad	Erläuterung
0	0	Keine Belastung
1-9	1	Geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten
10-19	2	Mittelgradige Belastung, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten Sollte der Einzelscore über 2 Tage lang bei 10 liegen, wird in Rücksprache mit dem Tierarzt/Leiter die Euthanasie durchgeführt.
20 oder höher (max. 60 möglich)	3	Hochgradige Belastung, Euthanasie bzw. Rücksprache mit Leiter/Tierarzt

Gesamtscore 20 oder höher (max. 60 möglich)

Die Tiere werden beim Erreichen eines Einzelscores von 20 euthanasiert, d.h. die Bewertung in einem der folgenden Kriterien „Körpergewicht“, „Allgemeinzustand“ sowie „Spontanverhalten“ mit einem Score 20 reicht zur Euthanasie aus. Bei einem Gesamtscore (durch Addition von Befunden aus den Scores 1, 5, und 10) von 20 oder mehr (max. 60 möglich), wird der Tierarzt/Projektleiter kontaktiert und es erfolgt in Absprache die Euthanasie.

8.3.2. Tabelle entzündliche und degenerative Veränderungen und Astrozytenaktivierung

Maus-stamm	Infektions-status	V-Nr.	Gene-tischer Status	Alter/DI (Tage)	Score entz. Veränderungen	Score Astrozyten-aktivierung
wt	BoDV	V382/12	+/+	21	0	0
wt	BoDV	V406/12	+/+	21	0	0
wt	BoDV	V440/12	+/+	21	0	0
wt	BoDV	V59/13	+/+	21	0	0
wt	BoDV	V112/13	+/+	21	0	0
wt	BoDV	V75/13	+/+	42	0	0
wt	BoDV	V77/13	+/+	42	0 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	0
wt	BoDV	V82/13	+/+	42	0 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	0
wt	BoDV	V83/13	+/+	42	0 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	0
wt	BoDV	V87/13	+/+	42	0 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus und Rhombencephalon)	0
MK41.3	BoDV	V381/12	tg/+	21	1	1
MK41.3	BoDV	V404/12	tg/+	21	1	1
MK41.3	BoDV	V437/12	tg/+	21	1	1
MK41.3	BoDV	V441/12	tg/+	21	1	1
MK41.3	BoDV	V57/13	tg/+	21	0,5 (dezentos Meninxinfiltrat auf Höhe Striatum)	0
MK41.3	BoDV	V71/13	tg/+	42	2 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus, vereinzelte dezentos Meninxinfiltrate)	2
MK41.3	BoDV	V73/13	tg/+	42	1,5 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus, dezentos Meninxinfiltrat)	2
MK41.3	BoDV	V78/13	tg/+	42	2 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus und Rhombencephalon)	2
MK41.3	BoDV	V79/13	tg/+	42	1,5 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus,	1,5

ANHANG

MK41.3	BoDV	V81/13	tg/+	42	dezentos Meninxinfiltrat auf Höhe Ammonshorn) 1,5 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus und Rhombencephalon, multifokale ggr. Meninxinfiltrate)	1,5
MK41.3	BoDV	V435/12	tg/tg	21	1 (ggr. Meninxinfiltrate auf Höhe Striatum)	1
MK41.3	BoDV	V436/12	tg/tg	21	1	1
MK41.3	BoDV	V438/12	tg/tg	21	1	1
MK41.3	BoDV	V439/12	tg/tg	21	0 (ggr. Blutung im Kleinhirn)	0
MK41.3	BoDV	V60/13	tg/tg	21	0	0
MK41.3	BoDV	V72/13	tg/tg	42	2,5 (vereinzelte dezentos Meninxinfiltrate)	3
MK41.3	BoDV	V74/13	tg/tg	42	2,5 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	2
MK41.3	BoDV	V76/13	tg/tg	42	2,5 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus, ggr. Meninxinfiltrate)	2
MK41.3	BoDV	V80/13	tg/tg	42	2 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	2
MK41.3	BoDV	V84/13	tg/tg	42	2 (ggr. Vakuolisierung im Striatum u. Thalamus)	2
wt	Mock	V110/13	+/+	21	0	0
wt	Mock	V111/13	+/+	21	0	0
wt	Mock	V122/13	+/+	42	0	0
wt	Mock	V123/13	+/+	42	0	0
MK41.3	Mock	V107/13	tg/+	21	0	0
MK41.3	Mock	V108/13	tg/+	21	0	0
MK41.3	Mock	V119/13	tg/+	42	0	0
MK41.3	Mock	V120/13	tg/+	42	0	0
MK41.3	Mock	V106/13	tg/tg	21	0	0
MK41.3	Mock	V140/13	tg/tg	21	0	0
MK41.3	Mock	V118/13	tg/tg	42	0	0
MK41.3	Mock	V179/13	tg/tg	42	0	0
wt	nicht	V100/11	+/+	21	0	-
wt	nicht	V99/11	+/+	21	0	-
wt	nicht	V98/11	+/+	21	0	-
wt	nicht	V97/11	+/+	21	0	-
wt	nicht	V96/11	+/+	21	0	-

ANHANG

wt	nicht	V5/12	+/+	42	0	-
wt	nicht	V128/11	+/+	42	0	-
wt	nicht	V124/11	+/+	42	0	-
wt	nicht	V123/11	+/+	42	0	-
wt	nicht	V106/11	+/+	42	0	-
MK41.3	nicht	V2/11	tg/+	21	0	-
MK41.3	nicht	V21/10	tg/+	21	0	-
MK41.3	nicht	V20/10	tg/+	21	0	-
MK41.3	nicht	V22/12	tg/+	21	0	-
MK41.3	nicht	V21/12	tg/+	21	0	-
MK41.3	nicht	V205/12	tg/+	42	0	-
MK41.3	nicht	V202/12	tg/+	42	0	-
MK41.3	nicht	V201/12	tg/+	42	0	-
MK41.3	nicht	V200/12	tg/+	42	0	-
MK41.3	nicht	V4/12	tg/+	42	0	-
MK41.3	nicht	V3/11	tg/tg	21	0	-
MK41.3	nicht	V1/11	tg/tg	21	0	-
MK41.3	nicht	V22/10	tg/tg	21	0	-
MK41.3	nicht	V19/10	tg/tg	21	0	-
MK41.3	nicht	V18/10	tg/tg	21	0	-
MK41.3	nicht	V6/12	tg/tg	42	0	-
MK41.3	nicht	V127/11	tg/tg	42	0	-
MK41.3	nicht	V126/11	tg/tg	42	0	-
MK41.3	nicht	V125/11	tg/tg	42	0	-
MK41.3	nicht	V120/11	tg/tg	42	0	-
TNFR1ko	BoDV	V286/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	BoDV	V287/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	BoDV	V288/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	BoDV	V289/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	BoDV	V290/14	d/d	21	0 (ggr. Hydrocephalus internus)	0
TNFR1ko	BoDV	V256/14	d/d	42	0 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus und Rhombencephalon)	0
TNFR1ko	BoDV	V257/14	d/d	42	0,5 (fokales Meninxinfiltrat auf Höhe Ammonshorn/Thala- mus)	0
TNFR1ko	BoDV	V258/14	d/d	42	0 (ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	0
TNFR1ko	BoDV	V259/14	d/d	42	0 (fokale Blutung, ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	0

ANHANG

TNFR1ko	BoDV	V260/14	d/d	42	0,5 (multifokale dezenzte Meninxinfiltrate, ganz ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	0
TNFR1ko	BoDV	V316/14	d/d	29	2 (mgr. mononukleäre Meningitis, Hydrocephalus internus, unregelmäßige CA3-Region im Ammonshorn mit Neuronennekrosen, z.T. vakuolierte Bereiche im Thalamus u. Rhombencephalon)	2
TNFR1ko	Mock	V312/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	Mock	V313/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	Mock	V331/14	d/d	42	0	0
TNFR1ko	Mock	V332/14	d/d	42	0	0
TNFR1ko	nicht	V238/12	d/d	21	0	0
TNFR1ko	nicht	V239/12	d/d	21	0	0
TNFR1ko	nicht	V240/12	d/d	21	0	0
TNFR1ko	nicht	V302/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	nicht	V303/14	d/d	21	0	0
TNFR1ko	nicht	V259/12	d/d	42	0	0
TNFR1ko	nicht	V260/12	d/d	42	0	0
TNFR1ko	nicht	V328/14	d/d	42	0	0
TNFR1ko	nicht	V329/14	d/d	42	0	0
TNFR1ko	nicht	V330/14	d/d	42	0	0
TNFR2ko	BoDV	V45/14	d/d	21	0	0
TNFR2ko	BoDV	V46/14	d/d	21	0,5 (einzelne dezenzte Meninxinfiltrate)	0
TNFR2ko	BoDV	V47/14	d/d	21	1	0
TNFR2ko	BoDV	V48/14	d/d	21	0,5 (einzelne dezenzte Meninxinfiltrate)	0
TNFR2ko	BoDV	V49/14	d/d	21	0,5 (einzelne dezenzte Meninxinfiltrate, Hydrocephalus internus)	0
TNFR2ko	BoDV	V64/14	d/d	42	0 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus und Rhombencephalon)	0
TNFR2ko	BoDV	V65/14	d/d	42	0 (ggr. Vakuolisierung im	0

ANHANG

TNFR2ko	BoDV	V66/14	d/d	42	Thalamus und Rhombencephalon) 0 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus und Rhombencephalon)	0
TNFR2ko	BoDV	V204/14	d/d	42	0 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus)	0
TNFR2ko	BoDV	V205/14	d/d	42	0 (ggr. Vakuolisierung im Thalamus und Rhombencephalon)	0
TNFR2ko	BoDV	V63/14	d/d	37	0 (nicht mehr frisch, aufgelockerte CA3-Region im Ammonshorn)	0 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V67/14	d/d	30	2 (nicht mehr frisch, ggr. mononukleäre Meningitis, ggr. Hydrocephalus internus, unregelmäßig aufgelockerte CA3-Region und Neuronennekrosen im Ammonshorn)	2,5 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V306/14	d/d	40	0,5 (nicht mehr frisch, fokal mononukleäre Infiltrate in Meninx, Ammonshorn aufgelockert, Gefäße stark gestaut, ggr. Vakuolisierung Thalamus)	0 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	Mock	V212/14	d/d	21	0	0
TNFR2ko	Mock	V213/14	d/d	21	0	0
TNFR2ko	Mock	V261/14	d/d	42	0	0
TNFR2ko	Mock	V262/14	d/d	42	0	0
TNFR2ko	nicht	V241/12	d/d	21	0	0
TNFR2ko	nicht	V242/12	d/d	21	0	0
TNFR2ko	nicht	V246/12	d/d	21	0	0
TNFR2ko	nicht	V211/12	d/d	21	0	0
TNFR2ko	nicht	V216/12	d/d	21	0	0
TNFR2ko	nicht	V399/12	d/d	42	0	0
TNFR2ko	nicht	V400/12	d/d	42	0	0
TNFR2ko	nicht	V401/12	d/d	42	0	0
TNFR2ko	nicht	V402/12	d/d	42	0	0
TNFR2ko	nicht	V403/12	d/d	42	0	0

BoDV: *Borna disease virus* 1; V-Nr.: Versuchsnummer; DI: Dauer der Infektion; entz.: entzündliche; wt bzw. +/-: Wildtyp, MK41.3: Mauslinie C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK; tg/tg: homozygot TNF-transgen; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; d/d: homozygot TNFR1 oder TNFR2 *knockout*; ggr.: geringgradig, mgr.: mittelgradig; CA3: *Cornu ammonis* 3; -: nicht durchgeführt

8.3.3. Tabelle Nachweis von BoDV-N

Maus-stamm	Infektionsstatus	V-Nr.	Genetischer Status	Alter/DI (Tage)	BoDV-N Score
wt	BoDV	V382/12	+/+	21	2,5
wt	BoDV	V406/12	+/+	21	2
wt	BoDV	V440/12	+/+	21	2
wt	BoDV	V59/13	+/+	21	2,5
wt	BoDV	V112/13	+/+	21	2,5
wt	BoDV	V75/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V77/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V82/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V83/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V87/13	+/+	42	3
MK41.3	BoDV	V381/12	tg/+	21	2,5
MK41.3	BoDV	V404/12	tg/+	21	3
MK41.3	BoDV	V437/12	tg/+	21	2,5
MK41.3	BoDV	V441/12	tg/+	21	3
MK41.3	BoDV	V57/13	tg/+	21	3
MK41.3	BoDV	V71/13	tg/+	42	3
MK41.3	BoDV	V73/13	tg/+	42	2
MK41.3	BoDV	V78/13	tg/+	42	3
MK41.3	BoDV	V79/13	tg/+	42	3
MK41.3	BoDV	V81/13	tg/+	42	3
MK41.3	BoDV	V435/12	tg/tg	21	2
MK41.3	BoDV	V436/12	tg/tg	21	2,5
MK41.3	BoDV	V438/12	tg/tg	21	2,5
MK41.3	BoDV	V439/12	tg/tg	21	3
MK41.3	BoDV	V60/13	tg/tg	21	3
MK41.3	BoDV	V72/13	tg/tg	42	2,5
MK41.3	BoDV	V74/13	tg/tg	42	3
MK41.3	BoDV	V76/13	tg/tg	42	2,5
MK41.3	BoDV	V80/13	tg/tg	42	3
MK41.3	BoDV	V84/13	tg/tg	42	3
wt	Mock	V110/13	+/+	21	0
wt	Mock	V111/13	+/+	21	0
wt	Mock	V122/13	+/+	42	0
wt	Mock	V123/13	+/+	42	0
MK41.3	Mock	V107/13	tg/+	21	0
MK41.3	Mock	V108/13	tg/+	21	0
MK41.3	Mock	V119/13	tg/+	42	0
MK41.3	Mock	V120/13	tg/+	42	0

ANHANG

MK41.3	Mock	V106/13	tg/tg	21	0
MK41.3	Mock	V140/13	tg/tg	21	0
MK41.3	Mock	V118/13	tg/tg	42	0
MK41.3	Mock	V179/13	tg/tg	42	0
TNFR1ko	BoDV	V286/14	d/d	21	2,5
TNFR1ko	BoDV	V287/14	d/d	21	3
TNFR1ko	BoDV	V288/14	d/d	21	2,5
TNFR1ko	BoDV	V289/14	d/d	21	3
TNFR1ko	BoDV	V290/14	d/d	21	2,5
TNFR1ko	BoDV	V256/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V257/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V258/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V259/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V260/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V316/14	d/d	29	2,5
TNFR1ko	Mock	V312/14	d/d	21	0
TNFR1ko	Mock	V313/14	d/d	21	0
TNFR1ko	Mock	V331/14	d/d	42	0
TNFR1ko	Mock	V332/14	d/d	42	0
TNFR2ko	BoDV	V45/14	d/d	21	2,5
TNFR2ko	BoDV	V46/14	d/d	21	2,5
TNFR2ko	BoDV	V47/14	d/d	21	3
TNFR2ko	BoDV	V48/14	d/d	21	3
TNFR2ko	BoDV	V49/14	d/d	21	3
TNFR2ko	BoDV	V64/14	d/d	42	3
TNFR2ko	BoDV	V65/14	d/d	42	3
TNFR2ko	BoDV	V66/14	d/d	42	3
TNFR2ko	BoDV	V204/14	d/d	42	3
TNFR2ko	BoDV	V205/14	d/d	42	3
TNFR2ko	BoDV	V63/14	d/d	37	2 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V67/14	d/d	30	2,5 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V306/14	d/d	40	2,5 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	Mock	V212/14	d/d	21	0
TNFR2ko	Mock	V213/14	d/d	21	0
TNFR2ko	Mock	V261/14	d/d	42	0
TNFR2ko	Mock	V262/14	d/d	42	0

BoDV: *Borna disease virus* 1; V-Nr.: Versuchsnummer; DI: Dauer der Infektion; wt bzw. +/-: Wildtyp, MK41.3: Mauslinie C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK; tg/tg: homozygot TNF-transgen; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; d/d: homogygot TNFR1 oder TNFR2 *knockout*

8.3.4. Tabelle Nachweis von GFAP

Maus-stamm	Infektionsstatus	V-Nr.	Genetischer Status	Alter/DI (Tage)	GFAP-Score
wt	BoDV	V382/12	+/+	21	1
wt	BoDV	V406/12	+/+	21	1
wt	BoDV	V440/12	+/+	21	1

ANHANG

wt	BoDV	V59/13	+/+	21	1
wt	BoDV	V112/13	+/+	21	1
wt	BoDV	V75/13	+/+	42	1
wt	BoDV	V77/13	+/+	42	1
wt	BoDV	V82/13	+/+	42	1
wt	BoDV	V83/13	+/+	42	1
wt	BoDV	V87/13	+/+	42	1
MK41.3	BoDV	V381/12	tg/+	21	1
MK41.3	BoDV	V404/12	tg/+	21	1,5
MK41.3	BoDV	V437/12	tg/+	21	1
MK41.3	BoDV	V441/12	tg/+	21	1
MK41.3	BoDV	V57/13	tg/+	21	1
MK41.3	BoDV	V71/13	tg/+	42	1,5
MK41.3	BoDV	V73/13	tg/+	42	1,5
MK41.3	BoDV	V78/13	tg/+	42	2
MK41.3	BoDV	V79/13	tg/+	42	1,5
MK41.3	BoDV	V81/13	tg/+	42	2
MK41.3	BoDV	V435/12	tg/tg	21	1,5
MK41.3	BoDV	V436/12	tg/tg	21	1
MK41.3	BoDV	V438/12	tg/tg	21	1
MK41.3	BoDV	V439/12	tg/tg	21	1
MK41.3	BoDV	V60/13	tg/tg	21	1,5
MK41.3	BoDV	V72/13	tg/tg	42	2
MK41.3	BoDV	V74/13	tg/tg	42	1,5
MK41.3	BoDV	V76/13	tg/tg	42	2
MK41.3	BoDV	V80/13	tg/tg	42	1,5
MK41.3	BoDV	V84/13	tg/tg	42	1,5
wt	Mock	V110/13	+/+	21	1
wt	Mock	V111/13	+/+	21	1
wt	Mock	V122/13	+/+	42	1
wt	Mock	V123/13	+/+	42	1
MK41.3	Mock	V107/13	tg/+	21	1
MK41.3	Mock	V108/13	tg/+	21	1
MK41.3	Mock	V119/13	tg/+	42	1
MK41.3	Mock	V120/13	tg/+	42	1
MK41.3	Mock	V106/13	tg/tg	21	1
MK41.3	Mock	V140/13	tg/tg	21	1
MK41.3	Mock	V118/13	tg/tg	42	1
MK41.3	Mock	V179/13	tg/tg	42	1
wt	nicht	V100/11	+/+	21	1
wt	nicht	V99/11	+/+	21	1
wt	nicht	V98/11	+/+	21	1
wt	nicht	V97/11	+/+	21	1
wt	nicht	V96/11	+/+	21	1
wt	nicht	V95/11	+/+	21	1
wt	nicht	V5/12	+/+	42	1
wt	nicht	V128/11	+/+	42	1

ANHANG

wt	nicht	V124/11	+/+	42	1
wt	nicht	V123/11	+/+	42	1
wt	nicht	V106/11	+/+	42	1
MK41.3	nicht	V2/11	tg/+	21	1
MK41.3	nicht	V21/10	tg/+	21	1
MK41.3	nicht	V20/10	tg/+	21	1
MK41.3	nicht	V22/12	tg/+	21	1
MK41.3	nicht	V21/12	tg/+	21	1
MK41.3	nicht	V205/12	tg/+	42	1
MK41.3	nicht	V202/12	tg/+	42	1,5
MK41.3	nicht	V201/12	tg/+	42	1
MK41.3	nicht	V200/12	tg/+	42	1
MK41.3	nicht	V4/12	tg/+	42	1
MK41.3	nicht	V3/11	tg/tg	21	1
MK41.3	nicht	V1/11	tg/tg	21	1,5
MK41.3	nicht	V22/10	tg/tg	21	1
MK41.3	nicht	V19/10	tg/tg	21	1
MK41.3	nicht	V18/10	tg/tg	21	1
MK41.3	nicht	V6/12	tg/tg	42	1
MK41.3	nicht	V127/11	tg/tg	42	1,5
MK41.3	nicht	V126/11	tg/tg	42	1
MK41.3	nicht	V125/11	tg/tg	42	1
MK41.3	nicht	V120/11	tg/tg	42	1,5
TNFR1ko	BoDV	V286/14	d/d	21	2
TNFR1ko	BoDV	V287/14	d/d	21	1,5
TNFR1ko	BoDV	V288/14	d/d	21	1,5
TNFR1ko	BoDV	V289/14	d/d	21	1,5
TNFR1ko	BoDV	V290/14	d/d	21	1,5
TNFR1ko	BoDV	V256/14	d/d	42	2
TNFR1ko	BoDV	V257/14	d/d	42	2
TNFR1ko	BoDV	V258/14	d/d	42	2,5
TNFR1ko	BoDV	V259/14	d/d	42	2
TNFR1ko	BoDV	V260/14	d/d	42	2
TNFR1ko	BoDV	V316/14	d/d	29	2,5
TNFR1ko	Mock	V312/14	d/d	21	1
TNFR1ko	Mock	V313/14	d/d	21	1
TNFR1ko	Mock	V331/14	d/d	42	1
TNFR1ko	Mock	V332/14	d/d	42	1
TNFR1ko	nicht	V238/12	d/d	21	1
TNFR1ko	nicht	V239/12	d/d	21	1
TNFR1ko	nicht	V240/12	d/d	21	1
TNFR1ko	nicht	V302/14	d/d	21	1
TNFR1ko	nicht	V303/14	d/d	21	1
TNFR1ko	nicht	V259/12	d/d	42	1
TNFR1ko	nicht	V260/12	d/d	42	1
TNFR1ko	nicht	V328/14	d/d	42	1
TNFR1ko	nicht	V329/14	d/d	42	1

ANHANG

TNFR1ko	nicht	V330/14	d/d	42	1
TNFR2ko	BoDV	V45/14	d/d	21	1,5
TNFR2ko	BoDV	V46/14	d/d	21	1,5
TNFR2ko	BoDV	V47/14	d/d	21	1,5
TNFR2ko	BoDV	V48/14	d/d	21	1,5
TNFR2ko	BoDV	V49/14	d/d	21	1,5
TNFR2ko	BoDV	V64/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V65/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V66/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V204/14	d/d	42	2,5
TNFR2ko	BoDV	V205/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V63/14	d/d	37	2 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V67/14	d/d	30	2 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V306/14	d/d	40	1,5 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	Mock	V212/14	d/d	21	1
TNFR2ko	Mock	V213/14	d/d	21	1
TNFR2ko	Mock	V261/14	d/d	42	1
TNFR2ko	Mock	V262/14	d/d	42	1
TNFR2ko	nicht	V241/12	d/d	21	1
TNFR2ko	nicht	V242/12	d/d	21	1
TNFR2ko	nicht	V246/12	d/d	21	1
TNFR2ko	nicht	V211/12	d/d	21	1
TNFR2ko	nicht	V216/12	d/d	21	1
TNFR2ko	nicht	V399/12	d/d	42	1
TNFR2ko	nicht	V400/12	d/d	42	1
TNFR2ko	nicht	V401/12	d/d	42	1
TNFR2ko	nicht	V402/12	d/d	42	1
TNFR2ko	nicht	V403/12	d/d	42	1

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; BoDV: *Borna disease virus* 1; V-Nr.: Versuchsnummer; DI: Dauer der Infektion; wt bzw. +/-: Wildtyp, MK41.3: Mauslinie C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK; tg/tg: homozygot TNF-transgen; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; d/d: homozygot TNFR1 oder TNFR2 *knockout*

8.3.5. Tabelle Nachweis von GLT1

Maus-stamm	Infektionsstatus	V-Nr.	Genetischer Status	Alter/DI (Tage)	GLT1 Score
wt	BoDV	V382/12	+/+	21	2
wt	BoDV	V406/12	+/+	21	1
wt	BoDV	V440/12	+/+	21	3
wt	BoDV	V59/13	+/+	21	-
wt	BoDV	V112/13	+/+	21	-
wt	BoDV	V75/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V77/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V82/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V83/13	+/+	42	-
wt	BoDV	V87/13	+/+	42	-

ANHANG

MK41.3	BoDV	V435/12	tg/tg	21	3
MK41.3	BoDV	V436/12	tg/tg	21	2
MK41.3	BoDV	V438/12	tg/tg	21	-
MK41.3	BoDV	V439/12	tg/tg	21	3
MK41.3	BoDV	V60/13	tg/tg	21	-
MK41.3	BoDV	V72/13	tg/tg	42	3
MK41.3	BoDV	V74/13	tg/tg	42	3
MK41.3	BoDV	V76/13	tg/tg	42	3
MK41.3	BoDV	V80/13	tg/tg	42	-
MK41.3	BoDV	V84/13	tg/tg	42	-
wt	Mock	V110/13	+/+	21	1
wt	Mock	V111/13	+/+	21	2
wt	Mock	V122/13	+/+	42	3
wt	Mock	V123/13	+/+	42	3
MK41.3	Mock	V106/13	tg/tg	21	3
MK41.3	Mock	V140/13	tg/tg	21	2
MK41.3	Mock	V118/13	tg/tg	42	3
MK41.3	Mock	V179/13	tg/tg	42	3
wt	nicht	V100/11	+/+	21	1
wt	nicht	V99/11	+/+	21	1
wt	nicht	V98/11	+/+	21	2
wt	nicht	V97/11	+/+	21	-
wt	nicht	V96/11	+/+	21	-
wt	nicht	V5/12	+/+	42	2
wt	nicht	V128/11	+/+	42	-
wt	nicht	V124/11	+/+	42	2
wt	nicht	V123/11	+/+	42	-
wt	nicht	V106/11	+/+	42	2
MK41.3	nicht	V3/11	tg/tg	21	3
MK41.3	nicht	V1/11	tg/tg	21	3
MK41.3	nicht	V22/10	tg/tg	21	2
MK41.3	nicht	V19/10	tg/tg	21	-
MK41.3	nicht	V18/10	tg/tg	21	-
MK41.3	nicht	V6/12	tg/tg	42	3
MK41.3	nicht	V127/11	tg/tg	42	2
MK41.3	nicht	V126/11	tg/tg	42	1
MK41.3	nicht	V125/11	tg/tg	42	-
MK41.3	nicht	V120/11	tg/tg	42	-
TNFR1ko	BoDV	V286/14	d/d	21	2
TNFR1ko	BoDV	V287/14	d/d	21	2
TNFR1ko	BoDV	V288/14	d/d	21	2
TNFR1ko	BoDV	V289/14	d/d	21	-
TNFR1ko	BoDV	V290/14	d/d	21	-
TNFR1ko	BoDV	V256/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V257/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V258/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V259/14	d/d	42	-

ANHANG

TNFR1ko	BoDV	V260/14	d/d	42	-
TNFR1ko	BoDV	V316/14	d/d	29	2
TNFR1ko	Mock	V312/14	d/d	21	1
TNFR1ko	Mock	V313/14	d/d	21	1
TNFR1ko	Mock	V331/14	d/d	42	2
TNFR1ko	Mock	V332/14	d/d	42	2
TNFR1ko	nicht	V238/12	d/d	21	2
TNFR1ko	nicht	V239/12	d/d	21	2
TNFR1ko	nicht	V240/12	d/d	21	3
TNFR1ko	nicht	V302/14	d/d	21	-
TNFR1ko	nicht	V303/14	d/d	21	-
TNFR1ko	nicht	V259/12	d/d	42	3
TNFR1ko	nicht	V260/12	d/d	42	3
TNFR1ko	nicht	V328/14	d/d	42	3
TNFR1ko	nicht	V329/14	d/d	42	-
TNFR1ko	nicht	V330/14	d/d	42	-
TNFR2ko	BoDV	V45/14	d/d	21	2
TNFR2ko	BoDV	V46/14	d/d	21	2
TNFR2ko	BoDV	V47/14	d/d	21	2
TNFR2ko	BoDV	V48/14	d/d	21	-
TNFR2ko	BoDV	V49/14	d/d	21	-
TNFR2ko	BoDV	V64/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V65/14	d/d	42	3
TNFR2ko	BoDV	V66/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V204/14	d/d	42	-
TNFR2ko	BoDV	V205/14	d/d	42	-
TNFR2ko	BoDV	V63/14	d/d	37	1 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V67/14	d/d	30	1 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V306/14	d/d	40	2 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	Mock	V212/14	d/d	21	2
TNFR2ko	Mock	V213/14	d/d	21	3
TNFR2ko	Mock	V261/14	d/d	42	3
TNFR2ko	Mock	V262/14	d/d	42	3
TNFR2ko	nicht	V241/12	d/d	21	2
TNFR2ko	nicht	V242/12	d/d	21	2
TNFR2ko	nicht	V246/12	d/d	21	3
TNFR2ko	nicht	V211/12	d/d	21	-
TNFR2ko	nicht	V216/12	d/d	21	-
TNFR2ko	nicht	V399/12	d/d	42	-
TNFR2ko	nicht	V400/12	d/d	42	-
TNFR2ko	nicht	V401/12	d/d	42	1
TNFR2ko	nicht	V402/12	d/d	42	2
TNFR2ko	nicht	V403/12	d/d	42	2

GLT1: Glutamattransporter 1; BoDV: *Borna disease virus* 1; V-Nr.: Versuchsnummer; DI: Dauer der Infektion; wt bzw. +/-: Wildtyp, MK41.3: Mauslinie C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK; tg/tg: homozygot TNF-transgen; d/d: homozygot TNFR1 oder TNFR2 *knockout*; -: nicht durchgeführt

8.3.6. Tabelle Nachweis von GLAST

Maus-stamm	Infektionsstatus	V-Nr.	Genetischer Status	Alter/DI (Tage)	GLAST Score
wt	BoDV	V382/12	+/+	21	3
wt	BoDV	V406/12	+/+	21	2
wt	BoDV	V440/12	+/+	21	3
wt	BoDV	V59/13	+/+	21	-
wt	BoDV	V112/13	+/+	21	-
wt	BoDV	V75/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V77/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V82/13	+/+	42	3
wt	BoDV	V83/13	+/+	42	-
wt	BoDV	V87/13	+/+	42	-
MK41.3	BoDV	V435/12	tg/tg	21	2
MK41.3	BoDV	V436/12	tg/tg	21	2
MK41.3	BoDV	V438/12	tg/tg	21	-
MK41.3	BoDV	V439/12	tg/tg	21	2
MK41.3	BoDV	V60/13	tg/tg	21	-
MK41.3	BoDV	V72/13	tg/tg	42	3
MK41.3	BoDV	V74/13	tg/tg	42	3
MK41.3	BoDV	V76/13	tg/tg	42	2
MK41.3	BoDV	V80/13	tg/tg	42	-
MK41.3	BoDV	V84/13	tg/tg	42	-
wt	Mock	V110/13	+/+	21	1
wt	Mock	V111/13	+/+	21	2
wt	Mock	V122/13	+/+	42	2
wt	Mock	V123/13	+/+	42	3
MK41.3	Mock	V106/13	tg/tg	21	2
MK41.3	Mock	V140/13	tg/tg	21	1
MK41.3	Mock	V118/13	tg/tg	42	1
MK41.3	Mock	V179/13	tg/tg	42	3
wt	nicht	V100/11	+/+	21	2
wt	nicht	V99/11	+/+	21	2
wt	nicht	V98/11	+/+	21	1
wt	nicht	V97/11	+/+	21	-
wt	nicht	V96/11	+/+	21	-
wt	nicht	V5/12	+/+	42	3
wt	nicht	V128/11	+/+	42	-
wt	nicht	V124/11	+/+	42	3
wt	nicht	V123/11	+/+	42	-
wt	nicht	V106/11	+/+	42	2
MK41.3	nicht	V3/11	tg/tg	21	3
MK41.3	nicht	V1/11	tg/tg	21	3
MK41.3	nicht	V22/10	tg/tg	21	3
MK41.3	nicht	V19/10	tg/tg	21	-
MK41.3	nicht	V18/10	tg/tg	21	-

ANHANG

MK41.3	nicht	V6/12	tg/tg	42	3
MK41.3	nicht	V127/11	tg/tg	42	3
MK41.3	nicht	V126/11	tg/tg	42	3
MK41.3	nicht	V125/11	tg/tg	42	-
MK41.3	nicht	V120/11	tg/tg	42	-
TNFR1ko	BoDV	V286/14	d/d	21	2
TNFR1ko	BoDV	V287/14	d/d	21	2
TNFR1ko	BoDV	V288/14	d/d	21	2
TNFR1ko	BoDV	V289/14	d/d	21	-
TNFR1ko	BoDV	V290/14	d/d	21	-
TNFR1ko	BoDV	V256/14	d/d	42	3
TNFR1ko	BoDV	V257/14	d/d	42	2
TNFR1ko	BoDV	V258/14	d/d	42	2
TNFR1ko	BoDV	V259/14	d/d	42	-
TNFR1ko	BoDV	V260/14	d/d	42	-
TNFR1ko	BoDV	V316/14	d/d	29	3
TNFR1ko	Mock	V312/14	d/d	21	2
TNFR1ko	Mock	V313/14	d/d	21	2
TNFR1ko	Mock	V331/14	d/d	42	2
TNFR1ko	Mock	V332/14	d/d	42	2
TNFR1ko	nicht	V238/12	d/d	21	2
TNFR1ko	nicht	V239/12	d/d	21	2
TNFR1ko	nicht	V240/12	d/d	21	2
TNFR1ko	nicht	V302/14	d/d	21	-
TNFR1ko	nicht	V303/14	d/d	21	-
TNFR1ko	nicht	V259/12	d/d	42	3
TNFR1ko	nicht	V260/12	d/d	42	2
TNFR1ko	nicht	V328/14	d/d	42	2
TNFR1ko	nicht	V329/14	d/d	42	-
TNFR1ko	nicht	V330/14	d/d	42	-
TNFR2ko	BoDV	V45/14	d/d	21	2
TNFR2ko	BoDV	V46/14	d/d	21	2
TNFR2ko	BoDV	V47/14	d/d	21	2
TNFR2ko	BoDV	V48/14	d/d	21	-
TNFR2ko	BoDV	V49/14	d/d	21	-
TNFR2ko	BoDV	V64/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V65/14	d/d	42	2
TNFR2ko	BoDV	V66/14	d/d	42	3
TNFR2ko	BoDV	V204/14	d/d	42	-
TNFR2ko	BoDV	V205/14	d/d	42	-
TNFR2ko	BoDV	V63/14	d/d	37	1 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V67/14	d/d	30	1 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	BoDV	V306/14	d/d	40	2 (nicht mehr frisch)
TNFR2ko	Mock	V212/14	d/d	21	2
TNFR2ko	Mock	V213/14	d/d	21	3
TNFR2ko	Mock	V261/14	d/d	42	3
TNFR2ko	Mock	V262/14	d/d	42	3

ANHANG

TNFR2ko	nicht	V241/12	d/d	21	2
TNFR2ko	nicht	V242/12	d/d	21	2
TNFR2ko	nicht	V246/12	d/d	21	2
TNFR2ko	nicht	V211/12	d/d	21	-
TNFR2ko	nicht	V216/12	d/d	21	-
TNFR2ko	nicht	V399/12	d/d	42	-
TNFR2ko	nicht	V400/12	d/d	42	-
TNFR2ko	nicht	V401/12	d/d	42	2
TNFR2ko	nicht	V402/12	d/d	42	3
TNFR2ko	nicht	V403/12	d/d	42	2

GLAST: Glutamat-Aspartat-Transporter; BoDV: *Borna disease virus 1*; V-Nr.:

Versuchsnummer; DI: Dauer der Infektion; wt bzw. +/-: Wildtyp, MK41.3: Mauslinie C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK; tg/tg: homozygot TNF-transgen; d/d: homozygot TNFR1 oder TNFR2 *knockout*; -: nicht durchgeführt

8.3.7. Tabelle Nachweis von aktivierter Caspase 3 (positive Zellen pro 10 HPF)

Maus- stamm	Infektions- status	V-Nr.	Gene- tischer Status	Alter/DI (Tage)	Cortex cerebri	Striatum	Ammons- horn	Thalamus	Cerebellum	Rhomben- cephalon	Gesamt
TNFR1ko	BoDV	V286/14	d/d	21	0	0	1	0	2	0	3
TNFR1ko	BoDV	V287/14	d/d	21	1	0	3	1	2	0	7
TNFR1ko	BoDV	V288/14	d/d	21	0	1	1	3	1	0	6
TNFR1ko	BoDV	V289/14	d/d	21	0	1	1	0	1	0	3
TNFR1ko	BoDV	V290/14	d/d	21	0	4	1	0	0	0	5
TNFR1ko	BoDV	V256/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR1ko	BoDV	V257/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR1ko	BoDV	V258/14	d/d	42	1	0	0	1	0	0	2
TNFR1ko	BoDV	V259/14	d/d	42	0	0	0	1	2	0	3
TNFR1ko	BoDV	V260/14	d/d	42	0	0	0	0	1	0	1
TNFR1ko	BoDV	V316/14	d/d	29	8	1	0	8	11	5	33
TNFR1ko	Mock	V312/14	d/d	21	0	2	0	0	0	0	2
TNFR1ko	Mock	V313/14	d/d	21	0	0	0	0	0	0	0
TNFR1ko	Mock	V331/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR1ko	Mock	V332/14	d/d	42	1	0	0	0	0	0	1
TNFR1ko	nicht	V238/12	d/d	21	1	0	3	0	0	0	4
TNFR1ko	nicht	V239/12	d/d	21	0	1	0	0	0	0	1
TNFR1ko	nicht	V240/12	d/d	21	0	0	2	0	0	0	2
TNFR1ko	nicht	V302/14	d/d	21	0	2	0	2	1	0	5
TNFR1ko	nicht	V303/14	d/d	21	0	0	3	1	2	0	6
TNFR1ko	nicht	V259/12	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR1ko	nicht	V260/12	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR1ko	nicht	V328/14	d/d	42	0	0	1	0	0	0	1
TNFR1ko	nicht	V329/14	d/d	42	1	0	0	0	0	0	1
TNFR1ko	nicht	V330/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0

ANHANG

TNFR2ko	BoDV	V45/14	d/d	21	0	0	1	1	0	2	4
TNFR2ko	BoDV	V46/14	d/d	21	0	4	2	2	0	1	9
TNFR2ko	BoDV	V47/14	d/d	21	1	0	0	0	1	1	3
TNFR2ko	BoDV	V48/14	d/d	21	0	0	1	0	0	0	1
TNFR2ko	BoDV	V49/14	d/d	21	0	0	0	0	0	1	1
TNFR2ko	BoDV	V64/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	BoDV	V65/14	d/d	42	0	1	0	0	0	0	1
TNFR2ko	BoDV	V66/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	BoDV	V204/14	d/d	42	0	1	0	0	0	0	1
TNFR2ko	BoDV	V205/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	BoDV	V63/14	d/d	37	3	3	7	3	2	2	20
TNFR2ko	BoDV	V67/14	d/d	30	31	23	4	16	70	8	152
TNFR2ko	BoDV	V306/14	d/d	40	2	8	0	0	0	0	10
TNFR2ko	Mock	V212/14	d/d	21	1	0	0	2	0	0	3
TNFR2ko	Mock	V213/14	d/d	21	1	1	1	0	1	0	4
TNFR2ko	Mock	V261/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	Mock	V262/14	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	nicht	V241/12	d/d	21	0	1	0	1	0	0	2
TNFR2ko	nicht	V242/12	d/d	21	1	2	0	0	0	0	3
TNFR2ko	nicht	V246/12	d/d	21	0	2	0	2	0	0	4
TNFR2ko	nicht	V211/12	d/d	21	0	1	1	0	0	0	2
TNFR2ko	nicht	V216/12	d/d	21	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	nicht	V399/12	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	nicht	V400/12	d/d	42	0	0	0	0	0	0	0
TNFR2ko	nicht	V401/12	d/d	42	0	0	0	0	0	1	1
TNFR2ko	nicht	V402/12	d/d	42	0	2	0	0	0	0	2
TNFR2ko	nicht	V403/12	d/d	42	0	0	1	0	0	0	1

HPF: high power field; BoDV: Borna disease virus 1; V-Nr.: Versuchsnummer; DI: Dauer der Infektion; d/d: homogygot TNFR1 oder TNFR2 knockout

8.3.8. Tabelle Nachweis von AIF (positive Zellen pro HPF)

Maus- stamm	Infektions- status	V-Nr.	Gene- tischer Status	Alter/DI (Tage)	Cortex cerebri	Striatum	Ammons- horn	Thalamus	Cerebellum	Rhomben- cephalon	Gesamt
wt	BoDV	V382/12	+/+	21	0	0	0	10	9	4	23
wt	BoDV	V406/12	+/+	21	0	1	0	4	6	18	29
wt	BoDV	V440/12	+/+	21	0	0	0	16	4	14	34
wt	BoDV	V59/13	+/+	21	-	-	-	-	-	-	-
wt	BoDV	V112/13	+/+	21	-	-	-	-	-	-	-
wt	BoDV	V75/13	+/+	42	0	4	0	7	5	29	45
wt	BoDV	V77/13	+/+	42	0	1	0	15	9	45	70
wt	BoDV	V82/13	+/+	42	0	0	0	15	13	15	43
wt	BoDV	V83/13	+/+	42	-	-	-	-	-	-	-
wt	BoDV	V87/13	+/+	42	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	BoDV	V381/12	tg/+	21	0	1	0	6	18	12	37
MK41.3	BoDV	V404/12	tg/+	21	0	0	0	4	23	24	51
MK41.3	BoDV	V437/12	tg/+	21	0	0	0	1	3	10	14
MK41.3	BoDV	V441/12	tg/+	21	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	BoDV	V57/13	tg/+	21	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	BoDV	V71/13	tg/+	42	0	0	0	6	9	6	21
MK41.3	BoDV	V73/13	tg/+	42	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	BoDV	V78/13	tg/+	42	0	0	0	20	8	19	47
MK41.3	BoDV	V79/13	tg/+	42	0	0	0	10	25	24	59
MK41.3	BoDV	V81/13	tg/+	42	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	BoDV	V435/12	tg/tg	21	0	2	0	7	17	63	89
MK41.3	BoDV	V436/12	tg/tg	21	0	1	0	6	6	18	31
MK41.3	BoDV	V438/12	tg/tg	21	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	BoDV	V439/12	tg/tg	21	0	2	0	4	34	38	78
MK41.3	BoDV	V60/13	tg/tg	21	-	-	-	-	-	-	-

ANHANG

MK41.3	BoDV	V72/13	tg/tg	42	0	0	0	0	1	8	12	21
MK41.3	BoDV	V74/13	tg/tg	42	1	1	0	0	8	16	9	35
MK41.3	BoDV	V76/13	tg/tg	42	0	0	0	0	8	6	13	27
MK41.3	BoDV	V80/13	tg/tg	42	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	BoDV	V84/13	tg/tg	42	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	Mock	V110/13	+/+	21	0	0	0	0	1	0	0	1
MK41.3	Mock	V111/13	+/+	21	0	1	0	0	4	10	26	41
MK41.3	Mock	V122/13	+/+	42	0	1	0	0	6	2	3	12
MK41.3	Mock	V123/13	+/+	42	0	0	0	0	4	11	5	20
MK41.3	Mock	V107/13	tg/+	21	0	0	0	0	0	2	3	5
MK41.3	Mock	V108/13	tg/+	21	0	1	0	0	0	1	3	5
MK41.3	Mock	V119/13	tg/+	42	0	7	0	0	10	26	29	72
MK41.3	Mock	V120/13	tg/+	42	0	5	0	0	4	19	20	48
MK41.3	Mock	V106/13	tg/tg	21	0	0	0	0	0	2	4	6
MK41.3	Mock	V140/13	tg/tg	21	0	0	0	0	0	12	14	26
MK41.3	Mock	V118/13	tg/tg	42	0	8	0	0	3	19	33	63
MK41.3	Mock	V179/13	tg/tg	42	0	7	0	0	11	2	4	24
MK41.3	nicht	V100/11	+/+	21	0	4	0	0	10	14	12	40
MK41.3	nicht	V99/11	+/+	21	0	1	1	0	3	4	14	23
MK41.3	nicht	V98/11	+/+	21	0	2	0	0	6	15	17	40
MK41.3	nicht	V97/11	+/+	21	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V96/11	+/+	21	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V5/12	+/+	42	0	7	0	0	15	21	33	76
MK41.3	nicht	V128/11	+/+	42	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V124/11	+/+	42	0	1	0	0	18	22	19	60
MK41.3	nicht	V123/11	+/+	42	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V106/11	+/+	42	0	1	0	0	18	28	33	80
MK41.3	nicht	V2/11	tg/+	21	0	0	0	0	13	11	6	30
MK41.3	nicht	V21/10	tg/+	21	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V20/10	tg/+	21	0	1	0	0	15	25	19	60

ANHANG

MK41.3	nicht	V22/12	tg/+	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V21/12	tg/+	21	0	1	0	0	2	6	6	-	15
MK41.3	nicht	V205/12	tg/+	42	0	0	0	0	10	1	15	26	
MK41.3	nicht	V202/12	tg/+	42	0	0	0	0	38	6	12	56	
MK41.3	nicht	V201/12	tg/+	42	0	4	0	0	18	2	10	34	
MK41.3	nicht	V200/12	tg/+	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V4/12	tg/+	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V3/11	tg/tg	21	0	3	1	0	37	26	55	122	
MK41.3	nicht	V1/11	tg/tg	21	0	0	0	0	3	9	26	38	
MK41.3	nicht	V22/10	tg/tg	21	0	5	0	0	5	8	17	35	
MK41.3	nicht	V19/10	tg/tg	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V18/10	tg/tg	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V6/12	tg/tg	42	0	24	0	0	29	4	33	90	
MK41.3	nicht	V127/11	tg/tg	42	0	13	0	0	7	22	22	64	
MK41.3	nicht	V126/11	tg/tg	42	0	2	0	0	8	9	22	41	
MK41.3	nicht	V125/11	tg/tg	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MK41.3	nicht	V120/11	tg/tg	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	BoDV	V286/14	d/d	21	2	3	0	0	6	24	26	61	
TNFR1ko	BoDV	V287/14	d/d	21	0	2	0	0	11	20	6	39	
TNFR1ko	BoDV	V288/14	d/d	21	0	1	0	0	20	23	25	69	
TNFR1ko	BoDV	V289/14	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	BoDV	V290/14	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	BoDV	V256/14	d/d	42	0	2	0	0	10	30	22	64	
TNFR1ko	BoDV	V257/14	d/d	42	0	0	0	0	7	9	16	32	
TNFR1ko	BoDV	V258/14	d/d	42	0	2	0	0	1	11	61	75	
TNFR1ko	BoDV	V259/14	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	BoDV	V260/14	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	BoDV	V316/14	d/d	29	0	0	0	0	27	15	5	47	
TNFR1ko	Mock	V312/14	d/d	21	0	0	0	0	6	25	16	47	
TNFR1ko	Mock	V313/14	d/d	21	0	0	0	0	6	12	33	51	

ANHANG

TNFR1ko	Mock	V331/14	d/d	42	0	8	0	34	58	37	137
TNFR1ko	Mock	V332/14	d/d	42	2	6	0	4	14	65	91
TNFR1ko	nicht	V238/12	d/d	21	0	2	0	16	10	35	63
TNFR1ko	nicht	V239/12	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	nicht	V240/12	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	nicht	V302/14	d/d	21	0	3	0	0	8	16	27
TNFR1ko	nicht	V303/14	d/d	21	4	4	1	1	20	16	46
TNFR1ko	nicht	V259/12	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	nicht	V260/12	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-
TNFR1ko	nicht	V328/14	d/d	42	0	4	0	14	57	31	106
TNFR1ko	nicht	V329/14	d/d	42	0	1	1	19	18	30	69
TNFR1ko	nicht	V330/14	d/d	42	0	6	0	4	11	29	50
TNFR2ko	BoDV	V45/14	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-
TNFR2ko	BoDV	V46/14	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-
TNFR2ko	BoDV	V47/14	d/d	21	0	3	0	4	28	24	59
TNFR2ko	BoDV	V48/14	d/d	21	0	1	0	5	29	2	37
TNFR2ko	BoDV	V49/14	d/d	21	0	10	0	15	12	9	46
TNFR2ko	BoDV	V64/14	d/d	42	0	6	0	36	47	28	117
TNFR2ko	BoDV	V65/14	d/d	42	0	4	0	14	17	45	80
TNFR2ko	BoDV	V66/14	d/d	42	0	2	0	12	45	24	83
TNFR2ko	BoDV	V204/14	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-
TNFR2ko	BoDV	V205/14	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-
TNFR2ko	BoDV	V63/14	d/d	37	0	0	0	0	0	1	1
TNFR2ko	BoDV	V67/14	d/d	30	0	2	0	2	1	2	7
TNFR2ko	BoDV	V306/14	d/d	40	1	0	0	0	11	1	13
TNFR2ko	Mock	V212/14	d/d	21	0	0	0	2	1	11	14
TNFR2ko	Mock	V213/14	d/d	21	0	1	0	6	3	13	23
TNFR2ko	Mock	V261/14	d/d	42	0	0	0	3	5	33	41
TNFR2ko	Mock	V262/14	d/d	42	0	0	0	8	0	2	10
TNFR2ko	nicht	V241/12	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-

ANHANG

TNFR2ko	nicht	V242/12	d/d	21	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR2ko	nicht	V246/12	d/d	21	0	2	0	8	7	46	63	-
TNFR2ko	nicht	V211/12	d/d	21	0	1	0	5	12	7	25	-
TNFR2ko	nicht	V216/12	d/d	21	0	1	0	1	11	18	31	-
TNFR2ko	nicht	V399/12	d/d	42	0	2	2	28	59	45	136	-
TNFR2ko	nicht	V400/12	d/d	42	0	0	2	17	66	32	117	-
TNFR2ko	nicht	V401/12	d/d	42	0	9	0	20	20	46	95	-
TNFR2ko	nicht	V402/12	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR2ko	nicht	V403/12	d/d	42	-	-	-	-	-	-	-	-

AlF: *apoptosis inducing* factor; HPF: *high power field*; BoDV: *Borna disease virus* 1; V-Nr.: Versuchsnummer; DI: Dauer der Infektion; wt bzw. +/-: Wildtyp. MK41.3: Mauslinie C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK; tg/tg: homozygot TNF-transgen; tg/+ : heterozygot TNF-transgen; d/d: homozygot TNFR1 oder TNFR2 *knockout*; -: nicht durchgeführt

8.4. TABELLEN *IN VITRO* UNTERSUCHUNGEN

8.4.1. Tabelle MTT-Assay nicht infizierte Astrozyten

Arithm. Mittelwert aus MTT-Assays (Prozent)	Kontrolle	0,5 ng/ ml TNF	1 ng/ ml TNF	5 ng/ ml TNF	10 ng/ ml TNF	5 mM Gluta- mat	50 mM Gluta- mat	0,5 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	1 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	5 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	10 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	0,5 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	1 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	5 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	10 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	Anz.
wt	100	88	85,2	77	69,1	86,9	100,9	87,1	98,4	97,8	105,4	86,7	98,1	98	103,1	3
tg/tg	100	85,9	82,5	75,1	66,5	94	99,2	80,7	89,9	82,6	83,7	79	90,1	90,3	84,9	3
TNFR1ko	100	92,5	91,1	89,7	88,9	103,7	101	94,1	99,2	100,7	97,6	91,3	99	97,7	90,7	4
TNFR2ko	100	84,5	84,3	74,5	68,4	94,8	94,8	102,7	116,2	108,9	123,9	96,8	100,3	108,2	97,3	2

Arithm.: arithmetischer; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; Anz.: Anzahl; wt: Astrozyten aus Wildtyp-Mäusen; tg/tg: Astrozyten aus homozygot TNF-transgenen Mäusen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*

8.4.2. Tabelle MTT-Assay BoDV-1-infizierte Astrozyten

Arithm. Mittelwert aus MTT-Assays (Prozent)	Kontrolle	0,5 ng/ ml TNF	1 ng/ ml TNF	5 ng/ ml TNF	10 ng/ ml TNF	5 mM Gluta- mat	50 mM Gluta- mat	0,5 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	1 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	5 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	10 ng/ml TNF + 5 mM Gluta- mat	0,5 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	1 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	5 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	10 ng/ml TNF + 50 mM Gluta- mat	Anz.
wt	100	94	93,4	86,3	81,6	114,9	111,5	119,7	118,6	112	111,3	111,1	116,7	111,4	106,1	2
tg/kg	100	88,1	84,8	72,7	68,9	117,9	106,6	114,7	114,5	112,3	112,3	111,8	112,2	114,8	113,6	2
TNFR1ko	100	101,9	99,9	98,2	97,1	106,4	100,8	103	101	100,5	93,7	108	108,4	113,1	111	2
TNFR2ko	100	93,1	88,2	82,5	76,8	124,6	108,8	112,1	107,3	103,7	102,4	102,5	94,2	94,3	92,7	2

Arithm.: arithmetischer; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; BoDV-1: Borna disease virus 1; Anz.: Anzahl; wt: Astrozyten aus Wildtyp-Mäusen; tg/kg: Astrozyten aus homozygot TNF-transgenen Mäusen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 knockout; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 knockout

8.4.3. Tabelle Rohwerte (optische Dichte) MTT-Assay nicht infizierte und BoDV-1-infizierte Astrozyten

Maus-stamm	Präp.-Nummer	Platten-nummer	BoDV-1-infiziert	Glutamat-dosis in mM	TNF-Dosis in ng/ml	Arithm. Mittelwert aus MTT-Assay	Jew. interne Nullkontrolle pro Platte
wt	1	1	nein	5	0	0,673	1,009
wt	1	1	nein	50	0	1,032	1,009
wt	2	2	nein	5	0	1,421	1,547
wt	2	2	nein	50	0	1,575	1,547
wt	3	3	nein	5	0	1,924	1,883
wt	3	3	nein	50	0	1,858	1,883
wt	4	4	nein	5	0	1,948	1,854
wt	4	4	nein	50	0	1,81	1,854
wt	1	1	nein	0	0,5	0,897	1,009
wt	1	1	nein	0	1	0,86	1,009
wt	1	1	nein	0	5	0,73	1,009
wt	1	1	nein	0	10	0,703	1,009
wt	2	2	nein	0	0,5	1,226	1,547
wt	2	2	nein	0	1	1,143	1,547
wt	2	2	nein	0	5	1,038	1,547
wt	2	2	nein	0	10	0,853	1,547
wt	3	3	nein	0	0,5	1,805	1,883
wt	3	3	nein	0	1	1,816	1,883
wt	3	3	nein	0	5	1,723	1,883
wt	3	3	nein	0	10	1,556	1,883
wt	4	4	nein	0	0,5	1,775	1,854
wt	4	4	nein	0	1	1,759	1,854
wt	4	4	nein	0	5	1,518	1,854
wt	4	4	nein	0	10	1,315	1,854
wt	1	5	nein	5	0,5	0,943	0,99
wt	1	5	nein	50	0,5	0,866	0,99
wt	1	5	nein	5	1	0,987	0,99
wt	1	5	nein	50	1	0,934	0,99
wt	2	6	nein	5	0,5	1,204	1,544
wt	2	6	nein	50	0,5	1,229	1,544
wt	2	6	nein	5	1	1,408	1,544
wt	2	6	nein	50	1	1,546	1,544
wt	3	7	nein	5	0,5	1,6	1,818
wt	3	7	nein	50	0,5	1,69	1,818
wt	3	7	nein	5	1	1,895	1,818
wt	3	7	nein	50	1	1,815	1,818
wt	1	8	nein	5	5	0,76	0,757

ANHANG

wt	1	8	nein	50	5	0,743	0,757
wt	1	8	nein	5	10	0,813	0,757
wt	1	8	nein	50	10	0,789	0,757
wt	2	9	nein	5	5	0,933	0,922
wt	2	9	nein	50	5	0,918	0,922
wt	2	9	nein	5	10	0,982	0,922
wt	2	9	nein	50	10	0,981	0,922
wt	3	10	nein	5	5	1,482	1,614
wt	3	10	nein	50	5	1,555	1,614
wt	3	10	nein	5	10	1,65	1,614
wt	3	10	nein	50	10	1,593	1,614
wt	1	11	ja	5	0	1,733	1,462
wt	1	11	ja	50	0	1,61	1,462
wt	2	12	ja	5	0	1,121	1,007
wt	2	12	ja	50	0	1,136	1,007
wt	1	13	ja	0	0,5	1,513	1,462
wt	1	13	ja	0	1	1,539	1,462
wt	1	13	ja	0	5	1,358	1,462
wt	1	13	ja	0	10	1,23	1,462
wt	2	14	ja	0	0,5	0,853	1,009
wt	2	14	ja	0	1	0,823	1,009
wt	2	14	ja	0	5	0,804	1,009
wt	2	14	ja	0	10	0,798	1,009
wt	1	15	ja	5	0,5	1,194	1,008
wt	1	15	ja	5	1	1,195	1,008
wt	1	15	ja	5	5	1,145	1,008
wt	1	15	ja	5	10	1,135	1,008
wt	2	16	ja	5	0,5	1,365	1,128
wt	2	16	ja	5	1	1,338	1,128
wt	2	16	ja	5	5	1,245	1,128
wt	2	16	ja	5	10	1,241	1,128
wt	1	17	ja	50	0,5	1,007	0,923
wt	1	17	ja	50	1	1,1	0,923
wt	1	17	ja	50	5	1,02	0,923
wt	1	17	ja	50	10	0,993	0,923
wt	2	18	ja	50	0,5	1,303	1,153
wt	2	18	ja	50	1	1,317	1,153
wt	2	18	ja	50	5	1,291	1,153
wt	2	18	ja	50	10	1,206	1,153
tg/tg	1	19	nein	5	0	0,964	1,195
tg/tg	1	19	nein	50	0	1,223	1,195
tg/tg	2	20	nein	5	0	1,473	1,476
tg/tg	2	20	nein	50	0	1,405	1,476
tg/tg	3	21	nein	5	0	1,804	1,776
tg/tg	3	21	nein	50	0	1,775	1,776

ANHANG

tg/tg	1	19	nein	0	0,5	0,809	1,195
tg/tg	1	19	nein	0	1	0,754	1,195
tg/tg	1	19	nein	0	5	0,672	1,195
tg/tg	1	19	nein	0	10	0,595	1,195
tg/tg	2	20	nein	0	0,5	1,461	1,476
tg/tg	2	20	nein	0	1	1,395	1,476
tg/tg	2	20	nein	0	5	1,271	1,476
tg/tg	2	20	nein	0	10	1,088	1,476
tg/tg	3	21	nein	0	0,5	1,614	1,776
tg/tg	3	21	nein	0	1	1,597	1,776
tg/tg	3	21	nein	0	5	1,475	1,776
tg/tg	3	21	nein	0	10	1,348	1,776
tg/tg	1	22	nein	5	0,5	0,847	1,201
tg/tg	1	22	nein	50	0,5	0,883	1,201
tg/tg	1	22	nein	5	1	1,018	1,201
tg/tg	1	22	nein	50	1	1,079	1,201
tg/tg	2	23	nein	5	0,5	1,103	1,379
tg/tg	2	23	nein	50	0,5	1,029	1,379
tg/tg	2	23	nein	5	1	1,234	1,379
tg/tg	2	23	nein	50	1	1,171	1,379
tg/tg	3	24	nein	5	0,5	1,611	1,76
tg/tg	3	24	nein	50	0,5	1,566	1,76
tg/tg	3	24	nein	5	1	1,681	1,76
tg/tg	3	24	nein	50	1	1,681	1,76
tg/tg	1	25	nein	5	5	0,966	1,268
tg/tg	1	25	nein	50	5	1,091	1,268
tg/tg	1	25	nein	5	10	0,815	1,268
tg/tg	1	25	nein	50	10	0,86	1,268
tg/tg	2	26	nein	5	5	0,851	1,203
tg/tg	2	26	nein	50	5	1,031	1,203
tg/tg	2	26	nein	5	10	0,998	1,203
tg/tg	2	26	nein	50	10	1,023	1,203
tg/tg	3	27	nein	5	5	1,547	1,532
tg/tg	3	27	nein	50	5	1,518	1,532
tg/tg	3	27	nein	5	10	1,592	1,532
tg/tg	3	27	nein	50	10	1,562	1,532
tg/tg	1	28	ja	5	0	1,128	0,886
tg/tg	1	28	ja	50	0	1,004	0,886
tg/tg	2	29	ja	5	0	1,019	0,94
tg/tg	2	29	ja	50	0	0,938	0,94
tg/tg	3	30	ja	5	0	1,679	1,424
tg/tg	3	30	ja	50	0	1,547	1,424
tg/tg	1	31	ja	0	0,5	0,525	0,6
tg/tg	1	31	ja	0	1	0,494	0,6
tg/tg	1	31	ja	0	5	0,421	0,6

ANHANG

tg/tg	1	31	ja	0	10	0,395	0,6
tg/tg	2	32	ja	0	0,5	0,347	0,391
tg/tg	2	32	ja	0	1	0,341	0,391
tg/tg	2	32	ja	0	5	0,294	0,391
tg/tg	2	32	ja	0	10	0,281	0,391
tg/tg	1	33	ja	5	0,5	1,495	1,391
tg/tg	1	33	ja	5	1	1,534	1,391
tg/tg	1	33	ja	5	5	1,445	1,391
tg/tg	1	33	ja	5	10	1,416	1,391
tg/tg	2	34	ja	5	0,5	1,557	1,276
tg/tg	2	34	ja	5	1	1,516	1,276
tg/tg	2	34	ja	5	5	1,541	1,276
tg/tg	2	34	ja	5	10	1,567	1,276
tg/tg	1	35	ja	50	0,5	1,477	1,322
tg/tg	1	35	ja	50	1	1,475	1,322
tg/tg	1	35	ja	50	5	1,53	1,322
tg/tg	1	35	ja	50	10	1,487	1,322
tg/tg	2	36	ja	50	0,5	1,406	1,256
tg/tg	2	36	ja	50	1	1,416	1,256
tg/tg	2	36	ja	50	5	1,43	1,256
tg/tg	2	36	ja	50	10	1,44	1,256
TNFR1ko	1	37	nein	5	0	1,385	1,423
TNFR1ko	1	37	nein	50	0	1,481	1,423
TNFR1ko	2	38	nein	5	0	1,211	1,131
TNFR1ko	2	38	nein	50	0	1,153	1,131
TNFR1ko	3	39	nein	5	0	1,893	1,82
TNFR1ko	3	39	nein	50	0	1,78	1,82
TNFR1ko	4	40	nein	5	0	1,821	1,713
TNFR1ko	4	40	nein	50	0	1,713	1,713
TNFR1ko	5	41	nein	5	0	1,842	1,78
TNFR1ko	5	41	nein	50	0	1,849	1,78
TNFR1ko	1	37	nein	0	0,5	1,208	1,423
TNFR1ko	1	37	nein	0	1	1,186	1,423
TNFR1ko	1	37	nein	0	5	1,182	1,423
TNFR1ko	1	37	nein	0	10	1,144	1,423
TNFR1ko	2	38	nein	0	0,5	1,057	1,131
TNFR1ko	2	38	nein	0	1	1,04	1,131
TNFR1ko	2	38	nein	0	5	0,983	1,131
TNFR1ko	2	38	nein	0	10	0,959	1,131
TNFR1ko	3	39	nein	0	0,5	1,736	1,82
TNFR1ko	3	39	nein	0	1	1,706	1,82
TNFR1ko	3	39	nein	0	5	1,687	1,82
TNFR1ko	3	39	nein	0	10	1,72	1,82
TNFR1ko	4	40	nein	0	0,5	1,652	1,713
TNFR1ko	4	40	nein	0	1	1,637	1,713

ANHANG

TNFR1ko	4	40	nein	0	5	1,649	1,713
TNFR1ko	4	40	nein	0	10	1,641	1,713
TNFR1ko	5	41	nein	0	0,5	1,735	1,78
TNFR1ko	5	41	nein	0	1	1,73	1,78
TNFR1ko	5	41	nein	0	5	1,762	1,78
TNFR1ko	5	41	nein	0	10	1,747	1,78
TNFR1ko	1	42	nein	5	0,5	1,023	1,307
TNFR1ko	1	42	nein	50	0,5	0,972	1,307
TNFR1ko	1	42	nein	5	1	1,035	1,307
TNFR1ko	1	42	nein	50	1	1,199	1,307
TNFR1ko	2	43	nein	5	0,5	0,998	0,95
TNFR1ko	2	43	nein	50	0,5	0,966	0,95
TNFR1ko	2	43	nein	5	1	1,097	0,95
TNFR1ko	2	43	nein	50	1	1,007	0,95
TNFR1ko	3	44	nein	5	0,5	1,502	1,729
TNFR1ko	3	44	nein	50	0,5	1,464	1,729
TNFR1ko	3	44	nein	5	1	1,559	1,729
TNFR1ko	3	44	nein	50	1	1,726	1,729
TNFR1ko	4	45	nein	5	0,5	1,701	1,599
TNFR1ko	4	45	nein	50	0,5	1,673	1,599
TNFR1ko	4	45	nein	5	1	1,791	1,599
TNFR1ko	4	45	nein	50	1	1,571	1,599
TNFR1ko	1	46	nein	5	5	1,033	0,996
TNFR1ko	1	46	nein	50	5	0,981	0,996
TNFR1ko	1	46	nein	5	10	1,08	0,996
TNFR1ko	1	46	nein	50	10	0,984	0,996
TNFR1ko	2	47	nein	5	5	1,033	0,928
TNFR1ko	2	47	nein	50	5	0,942	0,928
TNFR1ko	2	47	nein	5	10	0,873	0,928
TNFR1ko	2	47	nein	50	10	0,807	0,928
TNFR1ko	3	48	nein	5	5	1,551	1,546
TNFR1ko	3	48	nein	50	5	1,522	1,546
TNFR1ko	3	48	nein	5	10	1,414	1,546
TNFR1ko	3	48	nein	50	10	1,337	1,546
TNFR1ko	4	49	nein	5	5	1,408	1,608
TNFR1ko	4	49	nein	50	5	1,487	1,608
TNFR1ko	4	49	nein	5	10	1,553	1,608
TNFR1ko	4	49	nein	50	10	1,459	1,608
TNFR1ko	1	50	ja	5	0	1,853	1,736
TNFR1ko	1	50	ja	50	0	1,771	1,736
TNFR1ko	2	51	ja	5	0	1,894	1,785
TNFR1ko	2	51	ja	50	0	1,778	1,785
TNFR1ko	3	52	ja	5	0	1,031	0,945
TNFR1ko	3	52	ja	50	0	0,847	0,945
TNFR1ko	1	53	ja	0	0,5	1,817	1,736

ANHANG

TNFR1ko	1	53	ja	0	1	1,814	1,736
TNFR1ko	1	53	ja	0	5	1,798	1,736
TNFR1ko	1	53	ja	0	10	1,829	1,736
TNFR1ko	2	54	ja	0	0,5	1,612	1,626
TNFR1ko	2	54	ja	0	1	1,549	1,626
TNFR1ko	2	54	ja	0	5	1,509	1,626
TNFR1ko	2	54	ja	0	10	1,444	1,626
TNFR1ko	3	55	ja	0	0,5	0,682	0,835
TNFR1ko	3	55	ja	0	1	0,687	0,835
TNFR1ko	3	55	ja	0	5	0,676	0,835
TNFR1ko	3	55	ja	0	10	0,676	0,835
TNFR1ko	1	56	ja	5	0,5	0,726	0,739
TNFR1ko	1	56	ja	5	1	0,708	0,739
TNFR1ko	1	56	ja	5	5	0,723	0,739
TNFR1ko	1	56	ja	5	10	0,667	0,739
TNFR1ko	2	57	ja	5	0,5	0,912	0,846
TNFR1ko	2	57	ja	5	1	0,899	0,846
TNFR1ko	2	57	ja	5	5	0,873	0,846
TNFR1ko	2	57	ja	5	10	0,821	0,846
TNFR1ko	1	58	ja	50	0,5	0,933	0,805
TNFR1ko	1	58	ja	50	1	0,952	0,805
TNFR1ko	1	58	ja	50	5	1,028	0,805
TNFR1ko	1	58	ja	50	10	1,007	0,805
TNFR1ko	2	59	ja	50	0,5	0,893	0,893
TNFR1ko	2	59	ja	50	1	0,88	0,893
TNFR1ko	2	59	ja	50	5	0,88	0,893
TNFR1ko	2	59	ja	50	10	0,866	0,893
TNFR2ko	1	60	nein	5	0	0,932	0,95
TNFR2ko	1	60	nein	50	0	0,901	0,95
TNFR2ko	2	61	nein	5	0	1,207	1,319
TNFR2ko	2	61	nein	50	0	1,25	1,319
TNFR2ko	1	60	nein	0	0,5	0,799	0,95
TNFR2ko	1	60	nein	0	1	0,796	0,95
TNFR2ko	1	60	nein	0	5	0,699	0,95
TNFR2ko	1	60	nein	0	10	0,653	0,95
TNFR2ko	2	61	nein	0	0,5	1,119	1,319
TNFR2ko	2	61	nein	0	1	1,118	1,319
TNFR2ko	2	61	nein	0	5	0,994	1,319
TNFR2ko	2	61	nein	0	10	0,897	1,319
TNFR2ko	1	62	nein	5	0,5	1,029	0,944
TNFR2ko	1	62	nein	50	0,5	0,942	0,944
TNFR2ko	1	62	nein	5	1	1,073	0,944
TNFR2ko	1	62	nein	50	1	0,98	0,944
TNFR2ko	2	63	nein	5	0,5	1,154	1,196
TNFR2ko	2	63	nein	50	0,5	1,122	1,196

ANHANG

TNFR2ko	2	63	nein	5	1	1,42	1,196
TNFR2ko	2	63	nein	50	1	1,157	1,196
TNFR2ko	1	64	nein	5	5	0,858	0,744
TNFR2ko	1	64	nein	50	5	0,863	0,744
TNFR2ko	1	64	nein	5	10	1,045	0,744
TNFR2ko	1	64	nein	50	10	0,672	0,744
TNFR2ko	2	65	nein	5	5	0,909	0,887
TNFR2ko	2	65	nein	50	5	0,89	0,887
TNFR2ko	2	65	nein	5	10	0,952	0,887
TNFR2ko	2	65	nein	50	10	0,925	0,887
TNFR2ko	1	66	ja	5	0	1,391	1,118
TNFR2ko	1	66	ja	50	0	1,329	1,118
TNFR2ko	2	67	ja	5	0	0,55	0,441
TNFR2ko	2	67	ja	50	0	0,435	0,441
TNFR2ko	1	68	ja	0	0,5	0,852	0,942
TNFR2ko	1	68	ja	0	1	0,842	0,942
TNFR2ko	1	68	ja	0	5	0,763	0,942
TNFR2ko	1	68	ja	0	10	0,74	0,942
TNFR2ko	2	69	ja	0	0,5	0,431	0,45
TNFR2ko	2	69	ja	0	1	0,392	0,45
TNFR2ko	2	69	ja	0	5	0,378	0,45
TNFR2ko	2	69	ja	0	10	0,338	0,45
TNFR2ko	1	70	ja	5	0,5	1,409	1,186
TNFR2ko	1	70	ja	5	1	1,275	1,186
TNFR2ko	1	70	ja	5	5	1,229	1,186
TNFR2ko	1	70	ja	5	10	1,142	1,186
TNFR2ko	2	71	ja	5	0,5	0,43	0,408
TNFR2ko	2	71	ja	5	1	0,437	0,408
TNFR2ko	2	71	ja	5	5	0,423	0,408
TNFR2ko	2	71	ja	5	10	0,443	0,408
TNFR2ko	1	72	ja	50	0,5	1,036	0,983
TNFR2ko	1	72	ja	50	1	0,97	0,983
TNFR2ko	1	72	ja	50	5	0,965	0,983
TNFR2ko	1	72	ja	50	10	0,974	0,983
TNFR2ko	2	73	ja	50	0,5	0,434	0,436
TNFR2ko	2	73	ja	50	1	0,391	0,436
TNFR2ko	2	73	ja	50	5	0,394	0,436
TNFR2ko	2	73	ja	50	10	0,376	0,436

Arithm.: arithmetischer; Präp.-Nummer: Präparationsnummer; BoDV-1: *Borna disease virus* 1; MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid; jew.: jeweilige; wt: Wildtyp; tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*

8.4.4. Tabelle Nachweis GFAP und BoDV-N in Astrozytenkulturen

Mausstamm	wt	TNF-tg/tg	TNFR1ko	TNFR2ko
Mittelwert % GFAP-pos.	96,8	98,2	98,1	96,5
1. Präparation % GFAP-pos.	94,5	97,0	97,0	94,0
2. Präparation % GFAP-pos.	96,9	98,5	98,5	97,0
3. Präparation % GFAP-pos.	99,0	99,0	98,7	98,5
Mittelwert % BoDV-N-pos.	3,7	3,5	5,0	2,4
1. Präparation % BoDV-N-pos.	4,5	4,9	1,5	3,0
2. Präparation % BoDV-N-pos.	4,5	2,5	7,4	1,5
3. Präparation % BoDV-N-pos.	2,0	3,2	6,0	2,8

wt: Wildtyp; TNF-tg/tg: homozygot TNF-transgen; TNFR1ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 *knockout*; TNFR2ko: Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 *knockout*; GFAP: *glial fibrillary acidic protein*; pos.: positiv; BoDV-N: *Borna disease virus* 1 Nukleoprotein

8.5. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin Komplex
Abt.	Abteilung
ABV	aviäre Bornaviren
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Aktiengesellschaft
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
aktiv.	aktiviert(e)
ALS	amyotrophe laterale Sklerose
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid</i>
Anz.	Anzahl
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APAF1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
arithm.	arithmetischer
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATG	<i>autophagy-related gene</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2 protein(family)</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BH3	<i>Bcl2-homology-3</i>
biotinyl.	biotinyliert
BMP-2a	<i>bone morphogenetic protein 2a</i>
BMP-3	<i>bone morphogenetic protein 3</i>
BoDV-1	<i>Borna disease virus 1</i>
BoDV-G	<i>Borna disease virus 1</i> Glykoprotein
BoDV-L	<i>Borna disease virus 1 large protein</i>
BoDV-M	<i>Borna disease virus 1</i> Matrixprotein
BoDV-N	<i>Borna disease virus 1</i> Nukleoprotein
BoDV-P	<i>Borna disease virus 1</i> Phosphoprotein
BoDV-X	<i>Borna disease virus 1</i> X-Protein
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSL	Biosicherheitslabor
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i>
CA2	<i>Cornu ammonis 2</i>
CA3	<i>Cornu ammonis 3</i>
Casp.	Caspase
CCL2	CC-Chemokin-Ligand 2
CCL5	CC-Chemokin-Ligand 5
CD	cluster of differentiation
cDNA	<i>cellular deoxiribonucleic acid</i>
ciAP1	<i>cellular inhibitor of apoptosis 1</i>
ciAP2	<i>cellular inhibitor of apoptosis 2</i>
Co.	Compagnie
CO ₂	Kohlendioxid
ct	<i>threshold cycle</i>
Cy	Cyanin
DAB	Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride
DI	Dauer der Infektion
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DIV	<i>days in vitro</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpi	<i>days post infection</i>
EAAT1	<i>excitatory amino acid transporter 1</i>
EAAT2	<i>excitatory amino acid transporter 2</i>
EBLN	<i>endogenous bornavirus-like nucleoproteins</i>
ED ₅₀	Effektivdosis/Wirkdosis bei welcher bei 50 % der untersuchte Effekt auftritt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
et al.	et alii/aliae, und andere
euth.	euthanasiert
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FLIP	<i>FLICE-like inhibitory protein</i>
G	siehe BoDV-G
GABA	γ-Aminobuttersäure, Gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GDNF	<i>glial cell-line derived neurotrophic factor</i>
gest.	gestorben
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
Gln	Glutamin
GLT1	Glutamatttransporter 1
Glu	Glutamat
GluR	Glutamatrezeptor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GOI	<i>gene of interest</i>
gRNA	genomische Ribonukleinsäure
H&E	Hämatoxylin/Hämalaun und Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPF	<i>high power field</i> , 400faches Vergrößerungsfeld
HTLV-1	humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 1/humanes T-Lymphotropes Virus Typ 1
ID ₅₀	Infektionsdosis bei welcher 50 % der Zellen in Kultur infiziert wurden
IFNβ	Interferon β
IFNγ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IκB	<i>inhibitor of kappaB</i>
IKK	IκB-Kinase
IL-1	Interleukin 1
IL-1α	Interleukin 1α
IL-1β	Interleukin 1β
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
Inc.	<i>incorporated</i>
IP3	Inositoltriphosphat
IVETF	<i>International Veterinary Epilepsy Task Force</i>
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

ko	<i>knockout</i>
Konz.	Konzentration
L	siehe BoDV-L
LC3 A/B	<i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i>
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LCN2	Lipocalin 2
LPS	Lipopolysaccharid
M	siehe BoDV-M
MANF	<i>mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
max.	maximal
MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
Min	Minute
MK41.3	Mauslinie C57Bl/6-Tg(Grin2b-Tnf)41.3MK
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like</i>
MM	Mastermix
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
N	siehe BoDV-N
n	Anzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotidhydrid
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickoxid
NR2B	N-methyl-D-aspartat-Rezeptor (Subtyp) 2B
NS5A	nicht-Strukturprotein 5A (des Hepatitis-C-Virus)
NSV	neuroadaptiertes Sindbis-Virus
P	siehe BoDV-P
p	<i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit
p55	siehe TNFR1
p75	siehe TNFR2
PaBV	<i>parrot bornavirus</i>
PAP	Peroxidase anti Peroxidase
PAR	Poly-ADP-Ribose
PARP1	Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
p.i.	<i>post infectionem/post infection</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PTP	<i>permeability transition pore</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RIP	<i>receptor interacting protein kinase</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
Sek.	Sekunde(n)
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis

ANHANG

Stammlsg.	Stammlösung
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TACE	TNF α -converting-enzyme
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
tg	transgen
tg/+	heterozygot TNF-transgen
tg/tg	homozygot TNF-transgen
TGF β 1	<i>transforming growth factor β 1</i>
TLE	Temporallappenepilepsie
TMEV	<i>Theiler's murine encephalomyelitis virus</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
TNFR1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TNFR1ko	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 <i>knockout</i>
TNFR2	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2
TNFR2ko	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 2 <i>knockout</i>
TNF-tg	TNF-transgen
TRADD	<i>TNF-receptor-associated death domain</i>
TRAF2	<i>tumor-necrosis-factor-receptor-associated-factor 2</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
unverd.	unverdünnt
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VSVB-1	<i>variegated squirrel 1 bornavirus</i>
wt	Wildtyp
X	siehe BoDV-X
\bar{x}	Mittelwert
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Hiermit möchte ich herzlichst danken:

Frau Prof. Dr. Christiane Herden für ihre Betreuung und Unterstützung sowie für ihr Engagement und ihren Antrieb (wodurch einem sicher nie langweilig wurde).

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher für die Aufnahme ins Institut für Veterinär-Pathologie und seine unermütlche Förderung der deutschen Rechtschreibung und Grammatik.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt für die vermittelte Begeisterung und den Enthusiasmus für die Veterinär-Pathologie.

Herrn Dr. Markus Eickmann für die Unterstützung bei den virologischen *in vivo* Arbeiten und die Zurverfügungstellung der Arbeitsplätze und Räumlichkeiten.

Guido Schemken für die Unterstützung bei den *in vivo* Arbeiten.

Herrn Dr. Werner Hecht für die Hilfestellung und Unterstützung bei allen molekularbiologischen Sorgen und Problemen.

Herrn Dr. Klaus Failing und der AG Biomathematik für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Der von Bodelschwingschen Stiftungen Bethel, Gesellschaft für Epilepsieforschung e.V. für die finanzielle Unterstützung in Form eines 10-monatigen Stipendiums.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie die mich über die Zeit begleitet und auf vielfältige Weise unterstützt haben sowie das ein oder andere "Gezeter" von mir ertragen haben.

Silke Engel für Ihre unermütlche Unterstützung bei so vielen Laborarbeiten sowie für ihr offenes Ohr bei Sorgen und Problemen, trotz der teilweise etwas "lauteren Beschallung".

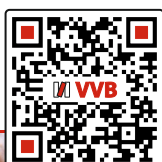
Kristine, Laura, Alex und Martin für die gute Einarbeitung im Institut, der ständigen Erinnerung, dass Plastikgegenstände nicht in den Steri gehören, sowie der Hilfe, Unterstützung und Gesellschaft bei allem rund um „Marburg“.

Julia, Lena, Nadine und Sabrina („Dieter“) für eine super schöne und lustige gemeinsame Zeit in der Patho die ich nie vergessen werde und eine tolle Freundschaft darüber hinaus.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für die unermütlche Unterstützung auf meinem Lebensweg sowie für die Sorgfalt, die Zielstrebigkeit und den Ehrgeiz der mir mitgegeben wurde.

Timo für die Geduld, Zuversicht und vielfältige Unterstützung.

Allen Tieren die das Leben so viel schöner machen und dem Mensch in so vielem weit voraus sind, insbesondere Luna, Flash, Orlando, Mephisto, Idefix, Konfetti, Charlie, Coco, Priamos, Lady, Billy, Lizzie und allen anderen tierischen Freunden auf meinem Lebensweg.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6630-7



9 783835 196630 7